

THESIS

MUNICH

1968

✓4

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT
PRÄZIPITIERENDER ANTIKÖRPER
VON KANINCHEN GEGEN LISTERIA
MONOCYTOGENES TYP 1 UND 4 b**

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

ANNEGRET BURGER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154017_0059

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für
Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Eyer

UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT PRÄZIPITIERENDER ANTIKÖRPER
VON KANINCHEN GEGEN LISTERIA MONOCYTOGENES TYP 1 UND 4b

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung
der
Doktorwürde
in der
gesamten Medizin
verfaßt und
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu
München

vorgelegt von
Annegret Burger
aus
Ludwigsburg

München
1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. H. Eyer
Dekan:	Prof. Dr. Manfred Kiese
Tag der mündlichen Prüfung:	20. 6. 1967

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	3
1) Bakterienstämme	3
2) Antigenbereitung zur Immunisierung, Agglutination u. KBR, sowie chemische Präparationen.	3
A a) nach Seeliger (List)	3
A b) nach Pick-Özgen (List)	4
A c) nach Welshimer (List)	4
B Staphylokokken und Enterokokken	4
C Listeria-Antigen der Asta Werke	5
3) Gewinnung der Immunsereen	5
3 a) Absorption nach Castellani	6
4) Präzipitinogenherstellung	6
a) Überstände gealterter Bouillonkulturen	6
b) Chem. Aufarbeitungen, die hauptsächlich Polysaccharide (KH) erfassen.	7
α) Extraktion mit Phenol (nach Palmer; Westphal)	7
β) Fällung mit 96% Äthanol (nach Beeck; Seeliger/Sulzbacher)	7
γ) nach Fuller	7
δ) nach Boivin, Mesrobianu	8
ε) nach Lancefield	8
c) Chem. Aufarbeitungen, die hauptsächlich Eiweiß (EW) erfassen.	8
α) Glycinlysat nach Patočka	8
β) Ammoniumsulfatfällung	9
γ) Extraktion im Alkalischen nach Potel	9
δ) Verfahren nach Kwapinski, mod.	9
5) Serologische Testmethoden	10
a) Agglutinationsreaktion (Aggl.) nach Widal	10
b) Komplementbindungsreaktion (KBR)	10

c)	Mikropräzipitation	10
d)	indirekte Hämagglutination	10
d 1)	mit Hammelblutkörperchen (HBK) (Middlebrooktest)	10
d 2)	mit tanninpräp. HBK (Boydentest)	11
e)	Agargeldiffusionstest (AGD) nach Ouchterlony.	11
6)	Elektrophorese und Immunelektrophorese	12
7)	Verfahren der Glycinsatfraktionierung	12
a)	fraktionierte Salzfällung	12
b)	Gelfiltration mit Sephadex G 200	12
c)	Ionenaustauscherchromatographie (DEAE und CAM)	13
d)	präparative Elektrophorese	13
8)	EW-bestimmung mittels Biuret-, KH-bestimmung mittels Molisch-Reaktion.	13

III. Ergebnisse 15

1)	Titerbestimmung der Immunsereen nach den routinemäßig durchgeführten serologischen Testverfahren (Tab. 1-3)	15
2)	Untersuchungen im präzipitierenden System	20
A)	AGD, Reaktionen im homologen System	22
A a)	Überstände alter Bouillönkulturen (Tab. 4)	22
A b)	Polysaccharidantigen (Tab. 5)	25
A c)	EW-Antigen (Tab. 6) und Interpretation der Ergebnisse a-c.	26
B)	AGD. Reaktionen im heterologen System	29
B a)	Antigenvergleich List. 1 - 4 b (Tab. 7; Abb. 3)	29
B b)	Antigenvergleich Listerien-Staphylokokken bzw. Enterokokken (Tab. 8, 9; Abb. 4)	32
C)	Mikropräzipitation	36
D)	Elektrophorese und Immunelektrophorese (Abb. 5)	36

3)	Versuche zur Fraktionierung des Glycinlysats	38
a)	fraktionierte Salzfällung	38
b)	Gelfiltration mit Sephadex G 200 (Abb. 6)	39
c)	Ionenaustauscherchromatographie (DEAE, CAM) (Abb. 7, Abb. 8)	39
d)	präparative Elektrophorese (Abb. 9)	41
4)	Versuche mit "50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sed. v. Glyly. List. 4b" (KBR, Middlebrooktest, Boydentest) bzw. "synthet. Nähr- med. List. 1" (Boydentest)	45
IV.	Diskussion	49
V.	Zusammenfassung	55

I. EINLEITUNG

Die Listeriose, eine Anthropo-Zoonose, wird durch die von Murray u. a. 1926 (75) und von Pirie 1927 (99) entdeckte, zur Familie der Corynebacteriaceae (14) gehörende *Listeria monocytogenes* hervorgerufen. Ein typisches Krankheitsbild existiert nicht; die einzelne Verlaufsform - die encephalo-meningitische Form, die anginosseptische, die oculoglanduläre und die septische Form der Neugeborenen (granulomatosis infantiseptica) (102, 103) - erlaubt auf Grund klinischer Symptome allein keine differentialdiagnostische Abgrenzung zu anderen Infektionskrankheiten (140). Pathologisch-histologisch weisen granulomatöse Gewebsveränderungen im Sinne eines "Listerioms" (27) nur bedingt auf eine Listeriose hin (48, 71, 105, 140). Ihre Diagnose kann nur bakteriologisch mit Sicherheit gestellt werden, doch der Erregernachweis ist schwierig, obwohl manche Vorschläge (Nährmedien, Temperatur etc.) zur selektiven Züchtung (10, 15, 38, 42, 52, 110 u. a.), sowie Methoden zur raschen Identifizierung des Keims mit Hilfe fluoreszierender Antikörper (5, 25, 26, 44, 144, 145, 146) angegeben sind. So scheint es naheliegend, zu serologischen Hilfsmitteln zu greifen. Die von Özgen (91), Patočka (97), Potel (103, 104, 109), Seeliger (134, 140) u. a. für die Listeriosediagnostik ausgearbeiteten Verfahren der KBR, Agglutination und indirekten Hämagglutination zeigen aber nicht selten auch positive Titer bei Menschen ohne klinischen oder anamnestischen Hinweis für eine bestehende oder durchgemachte Infektion mit Listerien (11, 69, 88, 91, 101, 105, 106, 132, 138, 160, 161, 164 u. a.). Das durch eine hohe Resistenz (66, 87, 163) bedingte, ubiquitäre Vorkommen der *Listeria monocytogenes* würde eine gewisse latente Durchseuchung erklären, doch ist eine derart weite Verbreitung, wie dies aus der Häufigkeit der beobachteten Antikörpertiter zu schließen wäre, unwahrscheinlich (2, 7, 68). Auch müßte man nach der bei der Immunisierung mit (abgetöteter) *Listeria monocytogenes* öfters gemachten Beobachtung einer verzögerten und schweren Antikörperbildung (69) einen intensiven Kontakt des Menschen mit dem Erreger fordern. Angaben hierüber, wie etwa eine häufig vorkommende Bakteriämie, liegen in der Literatur nicht vor. Es ist wahrscheinlicher, daß jene "Normalagglutinine" als Antikörper zu deuten sind, die gegen andere, mit *Listeria monocytogenes* Antigengemeinschaft zeigende Bakterien (vielleicht auch Viren und Pilze) gebildet worden sind. Über solche gemeinsamen Antigenstrukturen der Listerien mit Staphylokokken berichten Beeck (3), Drew (24), Seeliger und Sulzbacher (137), mit Enterokokken Seeliger (136), mit Streptokokken der Gruppe A Sachse und Potel (125), mit *Corynebacterium pyogenes* Potel (105) und mit L-Antigen von Colibakterien schließlich Jaeger und Myers (55).

Enterokokken können ständig von der Mund- oder Darmhöhle in die Lymph- und

Blutbahnen einbrechen (76, 113, 122) und zur Antikörperbildung stimulieren: Antikörper gegen Staphylokokken (4, 57, 77, 167) und Streptokokken (60, 61, 92, 121) werden häufig beobachtet. So ist die Bewertung serodiagnostischer Untersuchungen auf Listeriose mit einer gewissen Unsicherheit belastet: nur sehr hohe Titer oder Titeranstiege um mindestens zwei Verdünnungsstufen können zusammen mit dem klinischen Bild verwertet werden (105, 140 u. a.). Verbesserungen bzw. grundlegende Änderungen in der Listeriaserologie werden immer wieder gefordert: "The serodiagnostic methods available today should be revised, and no effort should be spared to find new serologic methods or more specific antigens". (111)

Im folgenden soll über immunologische Reaktionen verschiedenartig aufgearbeiteter Listerien-, Staphylokokken- und Enterokokkenextrakte im Eigen- und Fremdsérum berichtet werden, sowie über Versuche, ein listeriaspezifisches Antigen darzustellen bzw. einen listeriaspezifischen serologischen Test zu entwickeln.

II. MATERIAL UND METHODEN:

1) Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:

Listeria monocytogenes Paterson Typ 1-Stamm

Listeria monocytogenes 4b-Stamm Preuss 1071/53

Staphylococcus aureus b3

Enterococcus faecalis L48

Die Reinheit der Stämme wurde nach Koloniebildung und biochemischem Verhalten überprüft (117).

- 2) Antigenbereitung zur Immunisierung
zur Agglutination und KBR
zu chemischen Präparationen.

Aa) nach Seeliger (134, 140):

α) List. mon. Typ 1 und 4b wurden auf eine Blutplatte geimpft und 48 Stunden bei 37 °C gehalten.

Von einer glatten, keine Dissoziation (43, 52) zeigenden, gut hämolysierenden Kolonie wurde in 1% Traubenzuckerpeptonbouillon eine Kultur angelegt und nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C auf 1% Traubenzuckerpeptonagar ausgespatelt. Nach 48 Std. wurden die Bakterien mit 15 ml phosphatgepufferter physiologischer NaCl pro Drigalskischale abgeschwemmt, 1 Std. im Dampftopf gekocht und mit Phenol (Endkonz. 0,5 %) konserviert. Wegen der häufig zu beobachtenden Neigung zur Spontanagglutination (8) wurden die Bakterien für die Agglutinationsreaktion und zur Verwendung als Impfstoff im Ultrasonator kurz beschallt (20, 140). Für die KBR wurde nach Vorschlag von Seeliger (140) ein Mischantigen mehrerer Stämme der Typen 1 bzw. 4b genommen, um zufällige Schwankungen im Antigenbestand auszugleichen:

"List 1 (4b) NaCl Dato"

β) Von den gleichen Stämmen wurden Schwärmplatten nach Gard angelegt (0,8% Agar, 0,5% Fleischextrakt, 0,3% NaCl, 1% Pepton) und nach 48 Std. von der äußeren Schwärmzone die Bakterien in eine spezielle Listeria bouillon geimpft (10g Proteose, 10g Dextrose, 3g NaCl, 2g K₂HPO₄ ad 1000 ml Fleischwasser), 48 Std. bei 25-28 °C, der optimalen Temperatur für die Geißelausprägung (30, 45, 67, 95), bebrütet. sodann nach Beweglichkeitskontrolle im Dun-

kelfeld mit Formalin (Endkonz. 0,3%) oder durch 1-stündiges Erhitzen im Dampftopf getötet (118, 119).

"List 1 (4b) Bouill. Fo"

"List 1 (4b) Bouill. Dato".

3- bzw. 20-fach eingengte Suspensionen davon dienten als Impfstoff.

Ab) Nach Pick-Özgen (90)

List. 1 und 4b wurden 48 Std. bei 37°C auf Schrägagarröhrchen (Pepton) gezuchtet, mit je 2 cm³ 0,85% Phenol-NaCl-Lösung abgeschwemmt und 3 weitere Tage im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Eine starke Auflösung der Bakterien war zu beobachten.

Ac) Wachstum in synthetischen Nährmedien nach Angaben von Welshimer (165).

List. 1 und 4b wurden von 1% Traubenzuckerbouillon (vgl. II 2 a) in synthet. Nährmedien (A) Caseinhydrolysat (B) Lactalbuminhydrolysat (C) einzeln eingewogene Aminosäuren jeweils mit Vitaminzusatz (29) überimpft, 7 Tage bei 37°C bebrütet und mit Formalin (Endkonz. 0,3%) getötet.

"List 1 (4b)"

"synthet. Nährmed. "

"List 1 (4b) Cas. "

"List 1 (4b) Lact. "

"List 1 (4b) As. "

Die Vermehrung der Bakterien war in allen drei Nährmedien gleich gut, etwa entsprechend der in Traubenzuckerbouillon.

B) Staphylokokken und Enterokokken wurden nach den unter a) angegebenen Methoden gezuchtet, zum Teil durch einstündiges Autoklavieren bei 121°C, zum Teil durch einstündiges Erhitzen im Dampftopf oder durch Zugabe von Formalin (Endkonz. 0,5%) getötet:

"Staph. (Ent.) NaCl autokl. "

"Staph. (Ent.) NaCl Dato"

"Staph. (Ent.) NaCl Fo".

Durch Behandlung mit Formalin sollten die blockierenden, hitzelabilen Antigenstrukturen der Staphylokokken erhalten bleiben, durch Autoklavieren die tiefergelegenen, blockierten und hitzestabilen freigelegt werden (46, 84, 85, 86). Abwechselnd als Impfstoff gegeben ermöglichen sie die Gewinnung eines multivalenten Staphylokokkenimmunserums. Die Konzentration der Abschwemmung wurde belassen.

Nach Vorschlag von Seelemann u. a. (133) wurden die Enterokokken zu Impfzwecken folgendermaßen weiter aufgearbeitet:

"Ent. NaCl Dato" wurden 15 min. im kochenden Wasserbad mit n/20 HCl behandelt, abgekühlt und zentrifugiert (Lancefield, mod. Porges) (100). Der Überstand wurde tropfenweise mit 0,1 n NaOH unter Zusatz von 0,1% Alaun als Adjuvans bei pH5 neutralisiert. Das Endvolumen entsprach 80% (bzw. 8%) der ursprünglichen Bakteriensuspension. "Ent. Lancefield".

Die mit Formalin getöteten Enterokokken wurden mit einer Platinöse fein zerrieben und wiederholt mit Aceton ausgeschüttelt. Die Suspension wurde gegen Aqua dest. dialysiert, lyophilisiert und das Lyophilisat in so viel steriler phosphatgepufferter physiolog. NaCl-lösung aufgenommen, daß das Endvolumen auf 2/3 (bzw. 1/15) der ursprünglichen Bakterienaufschwemmung eingeengt war. "Ent. mechan. präp" (mod. nach Shattock (143) u. a. bzw. Seelemann u. a. (133)).

C) Die KBR wurde noch zusätzlich mit kommerziellem Listeria-Antigen 1 und 4b der Asta-Werke (Brackwede/Westf.) durchgeführt.

3) Herstellung der Immunseren:

Zur Immunisierung wurden ~2,5 kg schwere Kaninchen mit fehlendem oder niedrigem Titer an "Normalantikörpern gegen Listerien" verwendet.

Folgende Impfstoffe "List 1 (4b) Bouill. Dato" und "Bouill. Fo"

"Staph. NaCl autokl." und "Staph. NaCl Fo"

sowie

"Ent. Lancefield" und "Ent. mechan. präp."

wurden in der unter II 2a-d angegebenen Konzentration jeweils abwechselnd 3 Wochen lang in 2-3tägigem Abstand mit steigenden Dosen (0,5; 0,5-1,0; 1,0-1,5; 1,5-2,0; 2,0 ml) i. v. gegeben, wobei die Menge von 2ml nicht überschritten, sondern fortlaufend gegeben wurde. Nach 3-wöchiger Pause wurde ein weiterer 3-

wöchiger Immunisierungszyklus angeschlossen, wobei das Listeriaantigen 7-fach, das Enterokokkenantigen 10-fach eingeeengt, das Staphylokokkenantigen in der alten Konzentration belassen wurde. Am 5. Tag nach der letzten Injektion (133) wurden die Tiere mittels Ohrpunktion entblutet. Das bei 10 000 U/min gewonnene Serum wurde mit Merthiolat (1:10 000) versetzt, zu kleinen Portionen abgefüllt, bei -20°C eingefroren aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut. - Ein weiteres "sterile rabbit serum, pooled - no preservative" wurde von der Firma Baltimore Biological Laboratory bezogen.

3a) Absorption nach Castellani (18, 141, 155)

Zur Absättigung wurde 1cm^3 Immunserum in der Verdünnung 1:10 mit dem Sediment von 7cm^3 "Staph NaCl Dato" - bzw. 10cm^3 "Ent NaCl Dato" suspension gut gemischt, 1 Std. bei 37°C im Wasserbad gehalten, 10 min. bei 3000 U/min zentrifugiert und abpipettiert. Die oft nach der Absättigung zu beobachtende Eigenhemmung der Seren konnte durch Ausschütteln mit Kaolin weitgehend vermieden werden.

4) Präzipitinogenherstellung

Grundsätzlich wurde das Extraktionsverfahren nach den ersten Arbeitsgängen unterbrochen und zunächst der "ungereinigte" Extrakt getestet, da bei jeder weiteren Aufarbeitung mit dem Verlust von Antigenfaktoren zu rechnen war. Um mit ausreichenden Konzentrationen für den AGD-test arbeiten zu können, wurden Lösungen durch Lyophilisation eingeeengt, Sedimente in der kleinst möglichen Menge phosphatgepufferter, physiologischer NaCl pH7,2 aufgenommen.

a) Überstände gealterter Bouillonkulturen

Die nach II 2a-d gewonnenen Bakterienaufschwemmungen wurden 30 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden 2-3 Tage gegen aqua dest. dialysiert und lyophilisiert:

"List 1 (4b) Bouill. Fo"

"List 1 (4b) Bouill. Dato"

"List 1 (4b) Özgen"

"List 1 (4b) Traubenzuckerbouillon Fo"

List 1 (4b)	"List 1 (4b) Cas. Fo"
"synthet. Nährm. "	"List 1 (4b) Lact. Fo"
	"List 1 (4b) As.Fo"

bzw.	"Staph NaCl Fo"	"Ent NaCl Fo"
	"Staph NaCl Dato"	"Ent NaCl Dato"

b) Chemische Aufarbeitungen, die hauptsächlich Polysaccharide erfassen

✓) Extraktion mit Phenol: (nach Palmer (94); Westphal (166); 58)

Eine 2-5%ige Bakteriensuspension wurde mit gleichem Volumen 90% Phenol 30 min. unter ständigem Rühren bei 65-68°C extrahiert und rasch auf 4°C abgekühlt. Die dabei sich bildenden zwei Phasen trennten sich durch Zentrifugieren deutlicher, so daß die obere Schicht abpipettiert werden konnte. Die Phenolphase wurde nach einer weiteren Phenolbehandlung (wie oben angegeben) gegenfließendes, dann destilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert, zum Teil mit 4-fachem Volumen Methanol über Nacht über 4°C gefällt. Die Hauptmenge des Sediments konnte durch vorsichtiges Alkalisieren mit 0,5 n Natronlauge in Lösung gebracht werden. Zum abzentrifugierten, klaren Überstand wurde tropfenweise 0,5 n Essigsäure bis zum Auftreten eines Niederschlags gegeben.

"KH, wässrige Phase des Phenolextrakts List 1(4b) Bouill. Fo"

"KH, wässrige Phase des Phenolextrakts Staph (Ent) NaCl Fo"

"EW, Phenolphase lyo List 1 (4b) Bouill. Fo - Staph NaCl Fo - Ent NaCl Fo"

"EW, Phenol, Meth. CH_3COOH Staph NaCl Fo. - Ent NaCl Fo".

B) Nach Angaben von Beeck (3) bzw. Seeliger/Sulzbacher (137)

wurden Kulturüberstände mit 4-fachem Volumen 96% Äthylalkohol über Nacht bei 4°C gefällt.

"KH, Seeliger, List 1(4b) NaCl Fo"	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Biuret 0,5 mg/ml} \\ \text{Molisch +++} \end{array} \right.$
"KH, Seeliger Staph (Ent) NaCl Fo"	

8) Formamidextraktion nach Fuller (31)

Die Bakterien wurden mit Formamid (1g/40 cm³) 30 min. bei 160°C im Ölbad

extrahiert. Der nach Abkühlung durch Zentrifugieren gewonnene Überstand wurde mit 96% Äthanol fraktioniert gefällt. Die erste Trübung trat bei einer Konzentration von 65-70% auf.

"KH, Fuller I-V, List 1 (4b) Bouill. Fo"

"KH, Fuller, I-V, Staph (Ent) NaCl Fo"

g) Extraktion mit Trichloressigsäure (TCE) nach Boivin, Mesrobianu (9, 58)

Eine ~ 20 % Bakteriensuspension wurde mit gleichem Volumen 0,5 n TCE 5 Stunden im Eisbad behandelt, hochtourig zentrifugiert und der Überstand durch Lyophilisation eingeengt.

"KH TCE, List 1(4b) Bouill. Dato - Staph/Ent NaCl Dato"

h) Säureextraktion nach Lancefield (63, 72)

Die Bakterien wurden mit 50 x Volumen n/20 HCl 10 min im kochenden Wasserbad extrahiert, rasch abgekühlt, hochtourig zentrifugiert, mit NaOH neutralisiert, erneut zentrifugiert und der Überstand durch Gefriertrocknung eingeengt.

"KH, Lancefield List 1(4b) NaCl Dato - Staph/Ent NaCl Fo"

i) Chemische Aufarbeitungen, die hauptsächlich Eiweiß erfassen

1) Glycinlysat nach Patočka (98)

Eine 5% Suspension abgetöteter Bakterien in 1-molarer steriler Glykokoll-Lösung wurde 24 Std. bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt, mit sterilem Quarz 12 Std bei Zimmertemperatur geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand lyophilisiert.

"EW Glycinlysat, List 1(4b) Bouill. Fo": { Biuret 5-10 mg/ml
Molisch +++

"EW Glycinlysat Staph/Ent NaCl Fo"

β) Kulturüberstände wurden mit Ammoniumsulfat gefällt (60% Endkonz.)

"60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ List 1(4b) Bouill. Fo"

"60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ List 1 (4b) NaCl Dato!"

"60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Staph/Ent NaCl Fo"

γ) Extraktion im Alkalischen nach Potel und Degen (108)

Eine 1% Suspension von "List 1(4b) Bouill. Fo" in 0,5 n NaOH wurde mit Toluol überschichtet und 10 Tage bei 28 °C in N_2 -Atmosphäre gehalten. Der nach Toluolentfernung durch 30 min. Zentrifugieren bei 3000 U/min gewonnene Überstand wurde z. T. durch Lyophilisation eingeengt. "EW Potel lyo List 1(4b)", z. T. mit Essigsäure auf pH 4,6 angesäuert und 24 Std. bei 4 °C gefällt. Das Sediment ergab "EW_I Potel List 1 (4b)". Der Überstand wurde mit Na-Acetat abgestumpft, mit 2 x Vol. 96% Äthanol 24 Std. bei 4 °C gefällt und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde als "KH Potel List 1(4b)" bezeichnet, aus dem Überstand wurde durch Alkalisieren mit NaOH auf pH 11 eine 2. Eiweißfraktion gewonnen. "EW_{II} Potel List 1(4b)".

δ) Verfahren nach Kwapinski, mod. (62)

Überstände der Bouillonkulturen wurden mit Essigsäure auf pH 5 angesäuert und nach 24 Std. bei 15 000 U/min zentrifugiert. Das in Lösung gebliebene Material wurde über Nacht bei 4 °C mit 4-fachem Vol. eines Aceton-Äthanolgemisches (1:4) gefällt:

"KH Kwap. List 1(4b) Bouill. Fo"

"KH Kwap. List 1(4b) Traubenzuckerpeptonbouill. Fo"

"KH Kwap. Staph/Ent NaCl Fo"

"KH Kwap. Staph/Ent Pept. Bouill. Fo"

Das im sauren Milieu präzipitierte Material wurde in 0,15 m Veronal-Puffer pH 8,8 aufgenommen, sich nicht lösende Reste abzentrifugiert und zum klaren Überstand vorsichtig Essigsäure bis zum Auftreten der ersten Trübung gegeben.

"EW Kwap. List 1(4b) Bouill. Fo - Trzupeptonbouill. Fo"

"EW Kwap. Staph/Ent NaCl Fo - Peptbouill. Fo"

5) Serologische Testmethoden

Die Versuche wurden nur ausgewertet, wenn die gleichzeitig angesetzten Antigen- und Serumkontrollen ordnungsgemäß ausfielen und einwandfrei abzulesen waren.

a) Agglutinationsreaktion (Aggl.) nach Widal

Die inaktivierten Seren wurden mit physiolog. phosphatgepufferter NaCl-Lösung in geometrischer Reihe verdünnt und mit der gleichen Menge Antigensuspension versetzt, deren optimale Dichte in Vorversuchen ermittelt worden war. Nach 2-stündigem Aufenthalt in bewegtem Wasserbad bei 50°C (135°) und anschließendem 12-stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur (List) bzw. 4°C im Kühlschrank (Staph./Ent) wurde abgelesen. Die O-Agglutinate waren fein granuliert bis grobschollig, nicht zu zerschütteln, die H-Agglutinate weich, flockig, leicht aufzuwirbeln.

b) Komplementbindungsreaktion (KBR)

Anschließend an die einzelnen Vorversuche der Amboceptor- und Komplementtitration wurde der Hauptversuch im Verfahren der kurzfristigen Wärmebindung sowie der langfristigen Kältebindung mit optimal eingestellter Antigenkonzentration durchgeführt. Das vollständige Ausbleiben der Hämolyse gilt als positive Reaktion.

c) Mikropräzipitation in Glaskapillaren

Unverdünntes, nicht inaktiviertes Serum und das Präzipitinogen wurden zu gleichen Teilen in eine Glaskapillare aufgezogen. Als positiv wurde die Bildung eines weißen Präzipitatrings an der Grenzfläche nach 30 min bei 37°C bzw. eines Bodensatzes nach 18 Std. bei 4°C gewertet.

d) Indirekte Hämagglutination (nach Middlebrook-Dubos) (73)

Inaktivierte, zur Beseitigung von Heteroagglutininen mit Hammelblutkörperchen (HBK) absorbierte Seren wurden mit physiolog. Kochsalzlösung in geometrischer Reihe verdünnt. Zu jeder Verdünnungsstufe wurde die gleiche Menge einer

0,5%-igen sensibilisierten HBK-Suspension gegeben. (Die Sensibilisierung erfolgte mit geeigneter, im Vorversuch ermittelter Ag-Konzentration für 2 Std. im Wasserbad bei 37°C). Nach 15-stündiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurden starke Agglutinationen, dünne Häutchen-, Knopf- oder Ringbildungen mit unregelmäßigen Rändern als positiv, Knöpfe oder Ringe mit glatten Rändern als negativ gewertet.

d₂) Indirekte Hämagglutination mit tanninpräparierten Hammelblutkörperchen (HBK) (nach Boyden (13) bzw. Borduas und Grabar (12))

Statt unbehandelter HBK wurden mit Gerbsäure präparierte HBK (1 ccm HBK-Sediment mit 32,5 ccm 0,005 % Tanninlösung) 15 Min. bei Zimmertemperatur mit dem Antigen in geeigneter Konzentration sensibilisiert. Zur Stabilisierung wurde der physiologischen gepufferten Kochsalzlösung noch Rinderalbumin oder 0,35 % Polyvinylpyrrolidon zugesetzt. Inkubiert wurde 2 Std. bei 37°C im Brutschrank, anschließend 12 Std. bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank.

e) Agargeldiffusion (AGD) nach Ouchterlony (89)

Mit einem dünnen Agarfilm versehene Objektträger wurden mit je 2 ccm 1% Difco-Noble-Agar in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (0,15 M; pH 7,2; Merthiolatzusatz 1:10 000) übergossen. Nach dem Erstarren wurden Löcher in geeigneter geometrischer Anordnung (Abstand MB_1 1,3 cm; Winkel B_1 MB_2 50°) ausgestanzt, das Präzipitinogen sowie das unverdünnte, nicht inaktivierte Serum gleichzeitig eingefüllt und der Objektträger in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur (ohne große Temperaturschwankungen) für max. 10-14 Tage inkubiert. Die Objektträger wurden mit physiolog. NaCl-Lösung gut ausgewaschen, getrocknet und mit Ponceaurot gefärbt. Zwei Antigene, gegen dasselbe Serum bzw. zwei Seren, gegen dasselbe Antigen getestet, weisen bei Verschmelzung der Präzipitationslinien auf Identität, bei Spornbildung auf partielle, bei Überschneidung auf fehlende Identität der Antigene bzw. Antikörper hin (168, 169, 170). - Um das optimale Mengenverhältnis von Antigen zu Antikörper zu ermitteln, besonders aber zur Ausschaltung evtl. vorhandener Zonenphänomene, wurde zunächst jedes Präzipitinogen in mehreren Verdünnungsstufen gegen das unverdünnt belassene Serum getestet. Nicht direkt mit dem Immuns Serum reagierende Extrakte wurden parallel mit einem anderen Antigen-Präparat auf ihre Fähigkeit zur Deklination der dabei auftretenden Linien überprüft. Als Kontrolle dienten Ansätze mit phys. NaCl-Lösung und unbeimpftem Nährmedium (6) (Fleischwasser) anstelle des Antigens.

6) Elektrophoretische und immunoelektrophoretische Analysen im Agargel in der Mikromethode nach dem Verfahren von Grabar und Williams (41) bzw. Scheidegger (129)

Das Antigen wurde in der Mitte eines mit 2 cm^3 einer 1,8% Agarlösung in Veronalpuffer (pH 8,2; 0,05 M) überschichteten Objektträgers (Länge 7,5 cm) eingefüllt und im elektr. Feld bei 40 V und etwa 25-30 mA 40 min lang getrennt. Nach Zusatz von unverdünntem, nicht inaktiviertem Serum wurde das System bei Zitemp. 3-5 Tage inkubiert und wie oben angegeben gewaschen, getrocknet und gefärbt. Zur chemischen Analyse wurde das elektrophoretisch aufgetrennte Glycinlysate nach Fixierung mit 2% Trichloressigsäure mit Amidoschwarzfärbung (EW-darstellung) gefärbt, oder nach Fixierung mit 2% Essigsäure in 50% Alkohol (Glycoproteiddarstellung) bzw. mit 2% Essigsäure in 90% Alkohol (Polysacchariddarstellung) mit Perjodsäure-Formazan gefärbt.

7) Verfahren der Glycinlysatefraktionierung

a) fraktionierte Fällung mit Na_2SO_4 bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Das hochgesättigte "Glycinlysate" List 4b wurde zur Stabilisierung etwas alkalisiert und verdünnt, und vorsichtig mit gesättigter Salzlösung bis zum Auftreten der ersten Trübung versetzt. Nach 18-stündigem Aufenthalt im Kühlschrank wurde 15 min bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand einer neuen Salzfällung unterzogen.

b) Gelfiltration mit Sephadex G 200 (Pharmacia Uppsala)

"Glycinlysate List 4b" sowie das wieder in Lösung gebrachte Sediment einer 75% Ammoniumsulfatfällung des Glycinlysates wurden durch Sephadex-Gel in phosphatgepufferter physiologischer NaCl-Lösung, pH 7,2 filtriert, in Portionen zu 2 cm^3 aufgefangen (Durchlaufzeit 40 min bzw. 25 min pro 2 cm^3). Anhand kontinuierlicher Extinktionsmessung des Filtrats bei $2537\text{ \AA}$ wurden zusammengehörende Portionen zu Fraktionen gesammelt, lyophilisiert und das Lyophilisat in wenig physiologischer, phosphatgep. Kochsalzlösung aufgenommen.

- c) Anionenaustauscherchromatographie mit DEAE-zellulose, Kationenaustauscherchromatographie mit CAM-zellulose
-

"Glycinlysats List. 4b" wurde an DEAE-zellulose fixiert und schrittweise mit Pufferlösungen steigender Molarität und fallenden pH-Wertes eluiert; umgekehrt wurde an CAM-zellulose fixiertes "Glycinlysats List. 4b" mit Pufferlösungen zunehmender Molarität und zunehmenden pH-Wertes behandelt. Anhand kontinuierlicher Extinktionsmessung des Eluats bei $2537 \text{ \AA}$ wurden einzelne Fraktionen gebildet und durch Lyophilisation eingengt.

- d) Präparative Elektrophorese

Die Ergebnisse der elektrophoretischen und immunoelektrophoretischen Analysen gaben Richtlinien für die Anzahl und Breite der Streifen, in die der Agar sofort nach der elektrophoretischen Trennung des Glycinlysats (40 min bei 40 V) zerlegt wurde: Fraktion 1 = Präalbuminbereich; Fraktion 2 = Albumin- und z. T. Alpha₁bereich; Fraktion 3 = restlicher Alpha₁- und Alpha₂bereich; Fraktion 4 = Beta-bereich.

Die einzelnen Agarstreifen wurden eingefroren, langsam wieder aufgetaut und dabei Flüssigkeit (Fraktion 1-4) mechanisch abgepreßt, abpipettiert und im Exsikkator eingengt.

- 8) Die Eiweißkonzentration wurde mit der Biuret-(22), die Polysaccharidkonzentration mit der Molischreaktion (58) ermittelt.

III. ERGEBNISSE

1. Die Titer der Immunseren wurden nach den routinemäßig durchgeführten serologischen Testverfahren (134, 140), die als Bezugssystem für die Beurteilung weiterer Untersuchungen dienen sollten, bestimmt. (Tab. 1, 2, 3) Vergleicht man (Tab. 2) die homologen KBR-Titer der einzelnen Seren vor, nach dem 1. und 2. Immunisierungszyklus, so sind bei *Listeria monocytogenes* Typ 1 und 4b nach dem 2. Zyklus, bei Staphylokokken schon nach dem 1. Zyklus gute Werte, bei Enterokokken jedoch auch nach dem 2. Zyklus im Vergleich zu heterologen Titern auffallend geringe Werte zu verzeichnen. Die entsprechenden Ergebnisse in der Agglutinationsreaktion (Tab. 1) zeigen dagegen bei allen, auch den Enterokokken-Antiseren, genügend hohe Titer. Typisch ist das rasche und intensive Ansprechen der Kaninchen auf *Listeriageißelantigen*.

Der Antigenunterschied zwischen *Listeria monocytogenes* Typ 1 und Typ 4b kommt in den Ergebnissen der O-Agglutination deutlich zum Ausdruck, nicht dagegen in der H-Agglutination (Tab. 1). Mäßig ausgeprägt ist die Typendifferenz in den Ergebnissen der KBR (Tab. 2, Verfahren nach Seeliger). Das entspricht dem von Donker-Voet (23), Paterson (95, 96) und Seeliger-Linzenmeier (135, 140) mit Hilfe gegenseitiger Agglutinations- und Absorptionsversuche aufgestellten, durch die Anwendung der Phagen- (153, 154) und Fluoreszenztechnik (123, 144, 145) weitgehend bestätigten Antigenschema der beiden Typen gemeinsamen H-Faktoren (A, B) dagegen unterschiedlichen O-Faktoren (Typ 1: I, II, (III); Typ 4b: (III), Va und Vb). Bei der Antigenherstellung für die O-Agglutination und KBR (Verfahren nach Seeliger) wurden durch Hitzeeinwirkung die Geißeln vom Bakterienleib getrennt. Die Reaktion der Antikörper mit (thermostabilen) Geißelantigenen geht infolge ihres Komplementverbrauchs in die Ergebnisse der KBR, jedoch nicht in die der O-Agglutination ein, da die Ballung der vom Bakterienleib getrennten Geißeln einer neben der Agglutination nicht sichtbaren Präzipitation gleichkommt. Entsprechend ist auch in der KBR mit Asta-Antigen (formalingerötete, intakte Bakterien; Tab. 3!) als Summenreaktion mit Körper- und Geißelantigen der Unterschied von Typ 1 und 4b angedeutet, aber nicht so ausgeprägt wie in der O-Agglutination.

Ergebnisse der Agglutinationsreaktion:

(Versuchsansatz gleich nach dem Entbluten)

List. 1(4b) O-Aggl. = "List. 1 (4b) NaCl Dato"
 List. 1(4b) H-Aggl. = "List. 1 (4b) Bouill. Fo"
 Staph. - Aggl. = "Staph. NaCl Fo"
 Ent. - Aggl. = "Ent. NaCl Fo"

Anti-Serum	O-Aggl. List. 1 vor nach 1. Immun. Immun. Cyclus	H-Allg. List. 1 vor nach 2. Immun. Immun. Cyclus	List. 1 nach 1. Immun. Cyclus	O-Aggl. List. 4b vor nach 1. Immun. Cyclus	H-Aggl. List. 4b vor nach 1. Immun. Cyclus	Staph. Aggl. nach 2. nach 2. Immun. Cyclus	Ent. Aggl. nach 2. nach 2. Immun. Cyclus
List. 1 K7	- 160 640 -	- 640	2560	- 40 40	- 640 1280	160 40	
List. 1 K8	80 320 5120 -	- 640	5120	40 80 640 40	640 5120	80 20	
List. 4b K6	- 160 320 -	- 640	1280	- 640 5120 40	640 1280	20 20	
List. 4b K9	- 320 -	-	5120	- 5120 -	10240	20 10	
Staph. K4	- 160 160 -	- 40	40	- 160 80 -	80 40	10240 20	
Ent. K3	- 80 640 -	-	160	- - 80 -	40 40	10 640	
Ent. K5	- 320 2560 -	- 40	320	- 320 320	40 40	20 160	

Tab. 1

Angegeben ist der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung, die komplette Agglutination ergab.
 - keine Reaktion

Homologe Ag/Ak-Systeme sind durch Umrandung hervorgehoben.

Ergebnisse der KBR:

(Wärmebindung)

Verfahren nach SEELIGER

(Versuchsansatz gleich nach dem Entbluten)

"List. 1 (4b) NaCl Dato"

"Staph. NaCl Dato"

"Ent. NaCl Dato"

Anti-Serum	Listeria 1-Antigen					Listeria 4b-Antigen					Staph. Ag.		Ent. - Ag.	
	abgesättigt mit					abgesättigt mit								
	vor	nach 1. Cycl.	nach 2. Cycl.	Ent.	Immun	vor	nach 1. Cycl.	nach 2. Cycl.	Ent.	Immun	vor	nach 1. Cycl.	nach 2. Cycl.	nach 1. nach 2. Cycl.
List. 1 K7	-	160	640	160	320	-	20	160	80	80	5	320	160	- 5
List. 1 K8	5?	20	320	80	320	-	20	80	40	80	5	80	160	- 20
List. 4b K6	-	80	640	80	320	-	160	1280	320	640	-	40	80	- 5 20
List. 4b K9	-	160	80	160	160	-	-	320	80	160	-	-	40	- -
Staph. K4	-	5	40			-	10	5			5	1280	640	- - -
Ent. K3	-	40	160			-	10	20			5	20	40	- 10 20
Ent. K5	-	160	320			-	20	40			-	80	160	- 10 10

Tab. 2

Angegeben ist der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung, die 100 % Hämolysehemmung ergab.

- keine Reaktion

? unvollständige Hämolysehemmung in der 1. Serumverdünnung

Homologe Ag/Ak-Systeme sind durch Umrandung hervorgehoben.

Ergebnisse der KBR: (Versuchsansatz 9 Mon. nach dem Entbluten)

a) mit "Asta"-Antigen (Kältebindung)

b) Wiederholung: Verfahren nach SEELIGER (Wärmebindg.)

a) ASTA-AG				b) Verfahren nach SEELIGER				
Anti-serum		List. 1	List. 4b	List. 1 Ag	List. 1 Serum abge- sättigt m. Staph.	List. 4b Ag	List. 4b Serum abge- sättigt m. Staph.	Staph. Ag.
List. 1	K7	1024	256	640	160	80	20	320
List. 1	K8	1024	512	640	160	40	20	80
List. 4b	K6	512	4096	320	80	640	160	40
List. 4b	K9	128	1024	320	80	320	160	20
Staph.	K4	8	32	10		5		640
Ent.	K3	8	16	20		-		20
Ent.	K5	16	32	40		5		20
neg. "pooled"								
Kaninchen-serum		4?	4?	5?		-		5?

Tab. 3 Angegeben ist der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung, die 100 % Hämolysehemmung ergab. ? = unvollständige Hämolysehemmung in der 1. Serumverdünnung. Homologe Ag/Ak-Systeme sind durch Umrandung hervorgehoben. Nach 3/4-jähriger Aufbewahrung der Seren (-20 °C) war ein leichter Titerabfall im System *Listeria*-antigen/*Staphylokokken*- bzw. *Enterokokken*-Antiserum zu beobachten.

Untersuchungen im heterologen System Listerien-Staphylokokken/Enterokokken lassen bei den Listeria-Antiseren einen deutlichen Titeranstieg gegenüber Staphylokokken sowie Enterokokken erkennen (KBR Tab. 2); mit letzterem wird sogar der Wert des homologen Serums erreicht. Hier und in der Agglutinationsreaktion (Tab. 1) zeigt sich, daß Listeria Typ 1-Antiserum ausgeprägter als Typ 4b-Antiserum mit heterologem Antigen reagiert. (Vergl. Beeck (3) und Seeliger (137)). In umgekehrtem Ansatz - Staphylokokken-Antiserum gegen Listeria getestet - ist die Kreuzreaktion deutlich (Tab. 1, 2, 3), doch titermäßig unterhalb der homologen Werte. Dagegen überschreiten im Enterokokken-Antiserum die heterologen Listeriatiter die eigenen Werte (KBR, Tab. 2). Eine bevorzugte Reaktion der Staphylokokken-Enterokokken-Antiseren mit Listeria Typ 1-Antigen kommt nicht in der KBR mit Asta-Antigen (Tab. 3) zum Ausdruck, jedoch in der KBR-Verfahren nach Seeliger (Tab. 2)-und O-Agglutination (Tab. 1), interessanterweise - allerdings nur bei den Enterokokken-Antiseren - auch in der H-Agglutination (Tab. 1) trotz der oben erwähnten gemeinsamen H-Faktoren für Typ 1 und 4b.

Insgesamt ist eine erhebliche Einschränkung der Spezifität der einzelnen Immunsereen klar zu erkennen, welche auf einer partiellen Antigengemeinschaft zwischen Listerien und Staphylokokken einerseits (3, 24, 137), Listerien und Enterokokken (136) andererseits beruht. Eine allerdings mehr einseitige Kreuzreaktion zwischen Enterokokken und Staphylokokken deutet auf ein allen drei Bakterien gemeinsames Antigen hin: die Enterokokken-Antiseren reagieren in der Agglutination (Tab. 1) schwach, in der KBR (Tab. 2) deutlich - wieder titermäßig stärker als im homologen System - mit Staphylokokken; das Staphylokokken-Antiserum reagiert schwach in der Agglutination (Tab. 1), überhaupt nicht in der KBR (Tab. 2) mit Enterokokken.

Die Anwendung der Absorption nach Castellani, d. h. der quantitativen Bindung eines bestimmten Antikörpers durch Zusatz ausreichender Mengen des zugehörigen Antigens, ergeben bei der KBR (Tab. 2) im staphylokokkenabgesättigten Listeria-Antiserum einen nach den gegebenen Umständen zu erwartenden geringen Titerabfall. Die Titterschwankung im enterokokkenabgesättigten Listeria-Antiserum läßt sich demgegenüber infolge der niedrigen Werte im homologen System nicht sicher beurteilen.

2) Untersuchungen im präzipitierenden System:

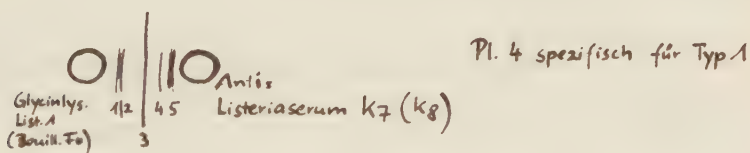
Die mangelnde Spezifität der Agglutinations- und Komplementbindungsreaktion zwingt zur Analyse der einzelnen Antigen-Antikörpersysteme in der Präzipitation. Zur Darstellung von Polysacchariden wurden hauptsächlich die klassischen Verfahren (47, 58, 131) wie Lancefield, Fuller, Boivin-Mesrobianu durchgeführt. Zur Extraktion von Eiweiß-Antigen wurde eine Hydrolyse in schwachsaurem Milieu bei 37°C (98) sowie eine Hydrolyse in alkalischem Milieu bei 28°C (108) gewählt. Auf eine besondere Fraktionierung zur spezifischen Erfassung von Lipoiden wurde verzichtet, da diese für vorliegende Fragestellung ungeeignet schienen; ein durch Behandlung mit Chloroform gewonnenes "monocytosis producing agent" (MPA von Stanley (148)) soll überhaupt nicht antigen wirken (21, 148); bei dem Lipoprotein von Potel und Degen (108) ist die allergene Eigenschaft im Peptidanteil verankert (21).

Als Bezugssystem für die Antigenanalyse im Agardiffusionstest nach Ouchterlony und als Grundlage für weitere Fraktionierungsversuche wurde jeweils die Bakteriengesamtpräparation gewählt, die mit dem korrespondierenden Immunsereum die meisten und am besten reproduzierbaren Präzipitationslinien (Pl) ergab. Die einzelnen Linien wurden mit Buchstaben oder arabischen Ziffern markiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden an ähnlicher Stelle auftretende, in ihrer Anzahl etwas variierende und nicht immer deutlich gegeneinander abgrenzbare Präzipitationslinien zu Komplexen zusammengefaßt. Ihre Betrachtung als Gruppe scheint für die hier durchgeführten Versuche ausreichend.

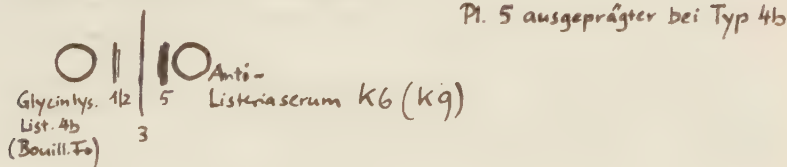
Bei "Glycinlysate *Listeria* 1/4b" (Abb. 1) zeigt die Antigengruppe 1/2 maximal 3, häufig aber nur 2 gegeneinander abgrenzbare Einzelfraktionen. Gegen das unverdünnte Serum getestet, präzipitiert sie noch in der Verdünnung 1:2; die entsprechenden Antikörper können bereits in dem nach dem 1. Immunisierungszyklus gewonnenen Serum, wenn auch nur andeutungsweise, nachgewiesen werden. Pl. 3 zeigt markantes Verhalten; sie ist einheitlich, scharf begrenzt und im Vergleich zu den anderen Linien am stärksten ausgeprägt. Noch in der Antigenverdünnung 1:8 ist sie - auch mit Serum nach dem 1. Immunisierungszyklus - deutlich nachweisbar. Die nur bei Typ 1 auftretende Pl 4 ist zwar scharf begrenzt, doch weniger dicht als Pl 3 und nur noch in der Verdünnung 1:2 erkennbar. Ag-5-Komplex erscheint meist als diffuses, breites Band, das sich im AGD in 2 (oder 3?) verschwommene Einzellinien zerlegen läßt, die - im Typ 4b-System deutlicher ausgeprägte - Intensität nimmt in Verdünnung 1:2 zu, um gleich wieder abzunehmen und bei 1:16 fast ganz zu verschwinden. Ag5 präzipitiert nur schwach mit Serum des 1. Immunisierungszyklus. Außer Pl 1-5 traten auch in höheren Ver-

Bezugssystem für die Antigenanalyse im AGD:

Listeria monocytogenes Typ 1



Listeria monocytogenes Typ 4b



Staphylococcus aureus b3



Enterococcus faecalis L48



Abb. 1 Die Zeichnungen stellen die Präzipitationsfiguren der einzelnen homologen Antigen-Antikörpersysteme im Agardiffusionstest dar. Näheres siehe Text.

dünnungsstufen (1:32) keine neuen Präzipitationslinien auf, so daß ein weiteres, bei der angewandten Antigenkonzentration infolge des Prozonophänomens nicht zur Darstellung kommendes Präzipitinogen praktisch auszuschließen war.

Bei "KH Kwap. Staphylokokken" (Abb. 1) sind die benachbarten, doch gut voneinander trennbaren Pl a und Pl b schärfer begrenzt und von größerer Intensität als Pl c und Pl d. Alle vier Linien können noch in höheren Verdünnungsstufen des Antigens (1:4 - 1:8) nachgewiesen werden. Wesentliche Unterschiede in der Reaktion mit Seren nach dem 1. und 2. Immunisierungszyklus sind - wie bei der Agglutinations- und Komplementbindungsreaktion - nicht zu erkennen.

Bei "KH Lancefield Enterokokken" (Abb. 1) erscheinen Pl o und Pl r undeutlich und nicht mit der Regelmäßigkeit wie Pl p/q. Letztere läßt sich in 3 Teilkomponenten analysieren, die auch noch in höheren Verdünnungsstufen (1:8) nachweisbar sind. Das nach dem 1. Immunisierungszyklus gewonnene Enterokokken-Antiserum ergab keine Reaktion.

In nachfolgenden Versuchen wurde jeder unter "Material und Methoden" (II, 4a-c) aufgeführte Bakterienextrakt einzeln auf seinen Antigengehalt im allgemeinen, im vergleichenden Ansatz auf die Antigenbeziehung zum homologen Standardantigen im besonderen geprüft. Anschließend wurden zur Kontrolle die verschiedenen Präparationen untereinander getestet. (Die eingesetzten Seren hatten zumindest anfangs den in der Aggl. (Tab. 1) und KBR (Tab. 2) ermittelten hohen heterologen Antikörpertiter; die kontinuierlich durchgeführten Versuche gaben im Ouchterlony-Test keinen Anhalt für einen Abfall dieses Titers).

2A) Reaktionen im homologen System - Versuche im Agargeldiffusionstest nach Ouchterlony.

Aa) "Überstände alter Bouillonkulturen"

Im homologen System Listeriaantigen, Listeriaantikörper treten Pl 1/2 in den meisten, Pl 5 - bzw. Teile dieses Komplexes - in allen Kulturüberständen auf (Tab. 4). Pl 3 ist nur im "Özgen"-Präparat deutlich zu erkennen. Da "List. Bouill. Dato" keine Reaktion gab, sind anhand dieser Versuchsergebnisse keine Hinweise auf Thermostabilität oder -labilität der einzelnen Antigene 1-5 gegeben. Es sei betont, daß es sich zum größten Teil um "überalterte" Kulturmedien handelte, die auch die während der Deklinationsphase durch Autolyse freiwerdenden Körper- und Geißelantigene enthielten. Somit wird verständlich, daß die selben Antigene wie die im-

Ergebnisse, "Überstände alter Bouillonkulturen" (AGD):

<u>Antigen:</u>	<u>List. mon. Typ 1</u>				<u>List. mon. Typ 4b</u>		
	(1/2)	(3)	(4)	?	5	(1/2)	(3) 5
Bouill. Fo	-					-	
Bouill. Dato							
Traub. zuck. bouill. Fo	(1/2) ?	4	5				5
"Syn- thet. Nähr. = med. "	{	Casein	4	5	{		5
		Lactalbumin	4	5			5
		Aminosäuren	4	5			5
			4	5			5
Özgen	1/2	3	(4)	?	5	1/2	3 5
 <u>Staphylococcus aureus b₃</u>							
<u>Antigen:</u> NaClFo	(a) ?	(b) ?	(d) ?				
NaCl Dato	-						
 <u>Enterococcus faecalis L48</u>							
<u>Antigen:</u> NaClFo	(p/q) ?						
NaCl Dato	(p/q) ?						

Tab. 4 Es sind die mit arabischen Ziffern bzw. Buchstaben markierten Präzipitationslinien (s. Abb. 1) angegeben, die in den einzelnen Antigenpräparationen enthalten sind.

- keine Reaktion

() Präzipitationslinie nur schwach ausgeprägt

? Identität mit entsprechender Präzipitationslinie des homologen Standardsystems fraglich

Chemische Aufarbeitungen, die hauptsächlich polysaccharide (KH) erfassen (AGD):

		<u>List. mon. Typ 1</u>		<u>List. mon. Typ 4b</u>	
<u>Antigen:</u>	wässrige Phase d. Phenol-extrakts (Bouill. Fo)	1/2		1/2	
	KH, nach Seeliger (NaClFo)	1/2	(3) 5	1/2	(3) 5
	KH, n. Fuller I 62, 5%	-		I 70%	-
	(Bouill. Fo) II 71 %	1/2		II 75%	-
	III 76 %	1/2		III 81%	-
	IV 85 %	1/2		IV 90%	-
	V 91 %	1/2			
	KH, TCE n. Boivin (Bouill. Dato)	(1/2)		-	
	KH, Lancefield (NaCl, Dato)	1/2	Teil v. 5	1/2	Teil v. 5
	KH, Potel (Bouill. Fo)	-		-	
	KH, Kwap. (Bouill. Fo)	-		-	
	KH, Kwap. (Traub. zuck. bouill.)	-		-	
		<u>Staphylococcus aureus b₃</u>		<u>Enterococcus faecalis L48</u>	
<u>Antigen:</u>	wässrige Phase des Phenolextraktes (NaClFo)	b		p/q	(r) ?
	KH, nach Seeliger (NaClFo) (b) d		(0) ?	p/q	(r) ?
	KH, Fuller (NaClFo) I 66% -		I 68%		-
	II 70% -		II 73%		-
	III 72, 5% -		III 78%		-
	IV 75, 5% -		IV 87%		-
	V 82, 5% -				
	KH, TCE n. Boivin (NaClFo) -		(p/q) ?		
	KH, Lancefield (NaClFo) (b) ?		(0)	p/q	r
	KH, Kwap. (NaClFo) a b c d			-	
	KH, Kwap. (pept. bouill. Fo) (a) ? (b) ? (d) ?			-	

Tab. 5 Es sind die mit arabischen Ziffern bzw. Buchstaben markierten Präzipitationslinien (s. Abb. 1) angegeben, die in den einzelnen Antigenpräparationen enthalten sind.

- keine Reaktion

() Präzipitationslinie nur schwach ausgeprägt

; Identität mit entsprechender Präzipitationslinie des homologen Standardsystems fraglich

mittelbar aus Bakterien gewonnenen Glycinlysantigene zur Darstellung kommen (z. B. im "Özgen"-Präparat). Abgesehen von der quantitativen Ausbeute bietet die Herstellung des Glycinlysats keinerlei im präzipitierenden System zu ererkennenden Vorteil gegenüber Kulturrückständen. Jedoch könnten in letzteren noch Ektotoxine vorhanden sein, die mit dem mit abgetöteten Bakterien gewonnenen Immunserum nicht zur Darstellung gelangen, aber möglicherweise zur Erfassung von Antitoxinen, wie sie im Verlauf einer natürlichen Infektion entstehen könnten, fähig sind. In der Literatur ist, abgesehen von einem Hämolysin (32, 37, 81, 83), nichts von gelösten Ektotoxinen berichtet (27). Entsprechende Versuche mit Kulturrückständen im Staphylokokken- und Enterokokkensystem ergaben keine oder nur unscharfe Präzipitationslinien (Tab. 4). Das Auftreten zusätzlicher, im betreffenden Standardpräparat nicht enthaltener Antigene konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

Ab) Chemische Aufarbeitungen, die hauptsächlich Polysaccharide erfassen:

Die Ergebnisse der Tab. 5 zeigen, daß nicht jeder Kohlehydratextrakt (KH-) unter den angegebenen Bedingungen eine sichtbare Präzipitationslinie ergab, was eher durch die begrenzte Empfindlichkeit der Testmethode, d. h. zu geringe Antigenkonzentration, als durch die Zerstörung der Antigenstruktur bei der chemischen Aufarbeitung bedingt sein dürfte. Drew (24) beschreibt z. B. eine Präzipitation mit Fullerextrakten aus *Listeria* im Röhrchentest, Seeliger eine positive KBR mit Trichloressigsäure-Extrakten (134, 140); vergl. auch Ergebnis III. 2C "Mikropräzipitation"! Auf jeden Fall lassen sich immunologisch identische Antigene mit Hilfe der verschiedenen Präparationen gewinnen, wenn auch in unterschiedlich quantitativer Ausbeute. Aus *Listeria monocytogenes* konnte durch Saurehydrolyse, durch Extraktion mit Phenol, Formamid (nicht Typ 4b) und Trichloressigsäure (nicht Typ 4b) die Antigengruppe 1/2 isoliert werden. Die durch fraktionierte Äthanol-fällung gewonnenen Einzelpräparationen Fuller I-V bei *Listeria* Typ 1 verhielten sich immunologisch identisch (Pl 1/2). Außer Pl 1/2 konnte bei der Präparation nach Lancefield noch ein Teilfaktor der Ag-5-Gruppe gewonnen werden. Die Heterogenität des Ag-5-Komplexes ist damit gesichert (KH und EW Komponenten) (s. Abb. 2). Die bei "KH. Seeliger" angedeutete Pl 3 erlaubt keinen Rückschluß auf die chemische Natur dieses Antigens, da durch eine Behandlung mit 96 % Alkohol auch die durch Formalin nicht zerstörten Eiweißstrukturen erfaßt werden.

Im Staphylokokken-System ergaben die Präparationen nach Fuller bzw. Boivin-Mesrobianu keine Reaktion. Untersuchungen mit den durch Salzsäure- bzw. Phenolbehandlung gewonnenen Extrakten weisen auf den KH-Charakter von Pl b hin

Vergleich KH, Lancefield List. / Glycinlysat List. im AGD :

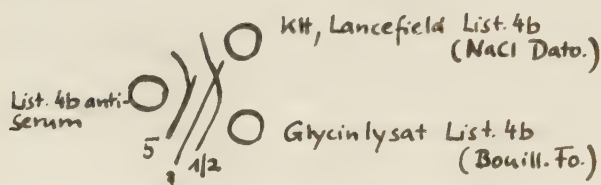


Abb. 2 Spornbildung der Präzipitationslinie P1 5 beweist Heterogenität von AG 5 (= KH- und EW-Komponenten?)

Die Verfahren nach Seeliger (137) oder Kwapinski (62) gewährleiten - es wurden keine weiteren Präparationen zur Reinigung angeschlossen - keine ausschließliche Erfassung von Polysacchariden, so daß hiermit keine sichere Differenzierung von P1 a, b, c, und d in EW- und KH-Antigene möglich ist. Nicht aus oben angeführten Versuchen - jedoch aus Reaktionen im heterologen System mit Listeriaantigen (Tab. 8, Abb. 4) geht hervor, daß es sich außer bei P1 b auch bei P1 a um ein Polysaccharid handeln dürfte.

Im Enterokokken- System läßt sich nach den Ergebnissen des Lancefield-Extraktes bei P1 o, P1 p/q und P1 r auf Polysaccharidantigene schließen. Mit den anderen, zur Erfassung von Polysacchariden durchgeführten Methoden, konnte vor allem Antigen p q isoliert werden. (Phenol- Trichloressigsäureextraktion).

Als die wesentlichen KH-Antigene können demnach Ag 1, 2 bei Listeria - Ag a bei Staphylokokken und Ag p/q bei Enterokokken angesprochen werden.

Ac) Chemische Aufarbeitungen - die hauptsächlich Eiweiß erfassen; und Interpretation der Ergebnisse a-c:

Die verschiedenen Aufarbeitungen desselben Materials - mit Hitze oder Formalin behandelte Kulturbedstände einerseits (als Gesamtpräparat lyophilisiert - mit Ammoniumsulfat bzw. Äthanol gefällt oder nach Angaben von Kwapinski mit

Chem. Aufarbeitungen, die hauptsächlich Eiweiß (EW) erfassen (Ergebnisse im AGD):

<u>Antigen:</u>	<u>List. mon. Typ 1</u>					<u>List. mon. Typ 4b</u>		
	1/2	3	4	5		1/2	3	5
Glycinlysät (Bouill, Fo)								
60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Bouill, Fo)	(1/2)	(3)	(4)	5		(1/2)	(3)	5
60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (NaCl Daro)	(1/2)					1/2		
Potel, EW Iyo	-					-		
Potel, EW I	-					-		
Potel, EW II	-					-		
EW Kwap. (Bouill Fo)	-					-		
EW Kwap. (pept. bouill, Fo)	-					-		
Phenolphase Iyo	-					-		

<u>Antigen:</u>	<u>Staphylococcus aureus b₃</u>		
	a	(c)	d
Glycinlysät (NaClFo)	ab	c	d
60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (NaClFo)			d
EW Kwap. (NaClFo)			d
EW Kwap. (Pept. bouill, Fo)			(d)?
Phenolphase Iyo			(d)?
Phenolphase, Meth, CH_3COOH		(b)	d

<u>Antigen:</u>	<u>Enterococcus faecalis L48</u>	
	p/q	r
Glycinlysät (NaClFo)	p/q	(r)?
60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (NaClFo)	-	
EW Kwap. (NaClFo)	-	
EW Kwap. (pept. bouill, Fo)	-	
Phenolphase Iyo	-	
Phenolphase, Meth., CH_3COOH	-	

Tab. 6 Es sind die mit arabischen Ziffern bzw. Buchstaben markierten Präzipitationslinien (s. Abb. 1) angegeben, die in den einzelnen Antigenpräparationen enthalten sind.

- keine Reaktion

() Präzipitationslinie nur schwach ausgeprägt

? Identität mit entsprechender Präzipitationslinie des homologen Standardsystems fraglich

Säure behandelt), Bakterien-Extraktionen andererseits (Glycinlysat; Phenolextraktion, Lancefield, Boivin oder Fuller) - sollten in ihrer Kombination Aufschluß über die chemische Natur der einzelnen Antigene (Differenzierung in KH und EW) geben.

Wie aus Tab. 6 hervorgeht, zeigen im Listeria-System die Eiweißaufarbeitungen (Potel lyo., Potel EW_I, Potel EW_{II} - vergl. hierzu (108) - EW Kwap., Phenolphase lyo.) keine spezifischen Eiweißlinien an. Die in "Glycinlysat" und "Kulturrückständen", jedoch nicht in den Polysaccharidpräparaten sowie "60% (NH₄)₂ SO₄NaCl Dato" - (Hitzeinwirkung!) enthaltenen Ag 3, Ag 4 und Hauptkomponente von Ag 5 lassen per exclusionem auf Proteinantigene schließen. Das fehlende Auftreten könnte durch zu geringe Konzentration bedingt sein; es ist aber unwahrscheinlich, daß die Konzentration in allen, der chemischen Aufarbeitung nach Proteine mitefassenden Präparationen - wie das Glycinlysat oder die Kulturrückstände - ausreichend, in allen Polysaccharidpräparationen dagegen ungenügend sein sollte. Bei letzteren konnten zudem evtl. in Frage kommende Zonenphänomene ausgeschlossen werden, d. h. auch in höheren Verdünnungen bildeten sich keine neuen Präzipitationslinien. Spätere Versuche bestätigen die Proteinatur zumindest von Ag 3 und einer Hauptkomponente von Ag 5 (III, 3a-d, 4). Im Staphylokokken-System gibt der Vergleich KH Kwap/ EW Kwap. bzw. wässrige Phase/ Phenolphase Hinweis auf die KH-Natur von Ag b und EW-Natur von Ag d. Die chemische Struktur des im Glycinlysat zusätzlich enthaltenen Ag c kann nicht sicher angegeben werden; die fehlende Präzipitation bei den Polysaccharidextrakten kann durch zu geringe Konzentration, eher jedoch durch Zerstörung bei der Aufarbeitung bedingt sein. Im Enterokokken-System gaben die Proteinpräparationen (EW Kwap., Phenolphase) keine Reaktion; das Glycinlysat zeigte im Vergleich zu "KH-Lancefield" keine weitere Präzipitationslinie an, so daß anzunehmen ist, daß in allen Präzipitationsversuchen mit Enterokokken-Antigen nur Polysaccharid- bestenfalls stabiles EW-Antigen (Lancefield-Extract aus formalinabgetöteten Enterokokken) zur Darstellung kommt.

Insgesamt ist nur der Proteincharakter von Ag 3 und Teilkomponenten von Ag 5 bei Listeria bzw. von Ag d bei Staphylokokken gesichert. Im Listeria-System scheint das Glycinlysat für weitere Untersuchungen eiweißhaltiger Antigene hinsichtlich Reproduzierbarkeit und quantitativer Ausbeute am geeignetsten.

2B) Reaktionen im heterologen System- Versuche im Agargeldiffusions-
test nach Ouchterlony

Ba) Antigenvergleich zwischen *Listeria monocytogenes* Typ 1 und 4b:

Zur Ermittlung von gruppen- (bzw. art-) und typenspezifischen Präzipitino-
 genen wurden im wechselseitigen Ansatz beide Typen-Antigene gegen je ein Typ-
 Antiserum und beide Typen-Antiseren gegen je ein Typ-Antigen getestet (Tab. 7,
 Abb. 3). Verschmelzung von P1 1/2 bzw. P1 3 lassen auf Identität, d.h. Grup-
 penspezifität von Ag 1/2 und Ag 3 schließen. Ag 5-Komplex ist in seinem
 Hauptanteil beiden Typen gemeinsam; eine Teilkomponente jedoch scheint spe-
 zifisch für Typ 4b zu sein, da in mehreren Antigenpräparationen (z.B. "Glycin-
 lysat" und "KH, Seeliger") der Ag 5-Komplex im Typ 4b-System sich stärker
 (d.h. zahlenmäßig mehr Einzellinien;) als im Typ 1-System darstellt. Umge-
 kehrt scheint eine meist zwischen P1 3 und P1 5 sich darstellende, als Ag 4 mar-
 kierte Präzipitationslinie spezifisch für Typ 1 zu sein. Sie ist besonders in "Gly-
 cinlysat List. 1" und "synthet. Nährmed. List 1" enthalten (Abb. 3). Insgesamt
 erscheinen die Antigengemeinschaften im Agargeldiffusionstest viel ausgepräg-
 ter als in der Komplementbindungsreaktion oder O-Agglutination (Tab. 1-3).

Antigenvergleich zw. List. mon. Typ 1 und Typ 4b (AGD):

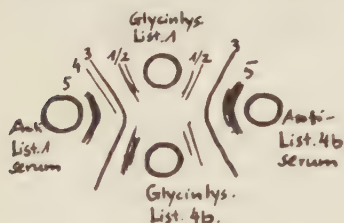
Im wechselseitigen Ansatz beider Typ-antigene gegen je ein Typ-antiserum bzw. beider Typ-antisera gegen je ein Typantigen ergab sich:

	Ver- schmelzg. von Pl. 1/2	Ver- schmelzg. von Pl. 3	isoliertes Auf- treten von Pl. 4 im List. 1- syst.	Verschmelzg. des Hauptan- teils v. Pl. 5; bzw. Teilkomp. isoliert im List. 4b-syst.
<u>Listeria-Antigen:</u>				
Bouill. Fo	(+)	(+)	-	+
Casein	} synthet. Nähr= med.			
Lact. alb.				
Aminosäuren				
Özgen	+	+	-	+
wässrige Phase des Phenolextrakts	+	-	-	-
KH, Seeliger	+	(+)	-	+!
KH, Lancefield	+	-	-	(+)
Glycinlysate	+	+	!	+!

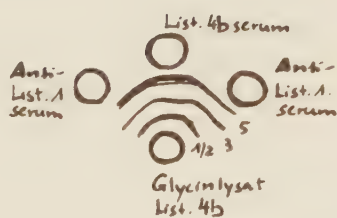
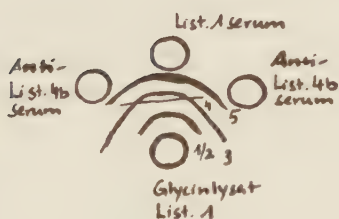
- Tab. 7 + Verschmelzung der Präzipitationslinien
 () Präzipitationslinie nur schwach ausgeprägt
 - keine Reaktion
 ! Typenspezifität a) Pl 4 ist spezifisch für List. Typ 1
 b) Teilkomponente von Pl 5 ist spezifisch
 für List. mon. Typ 4b

Antigenvergleich zwischen List. mon. Typ 1 und Typ 4b (AGD):

Glycinlysate



Ag 4 ist spezifisch für Typ 1
Ag 5-komplex bei Typ 4b ausgeprägter



"synthet. Nährmedium" gegen Glycinlysate getestet

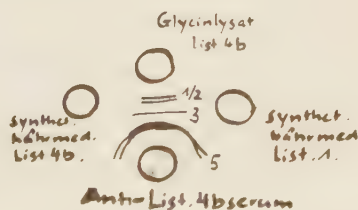
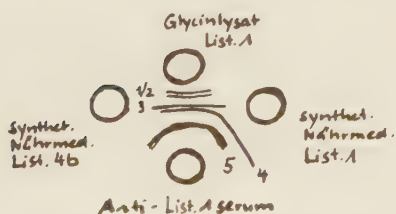


Abb. 3 Die Präzipitationsfiguren mit Glycinlysate lassen ausgeprägte Antigengemeinschaft zwischen *Listeria monocytogenes* Typ 1 und Typ 4b erkennen (Ag 1/2; Ag 3; Hauptanteil von Ag 5). Nur Ag 4 scheint spezifisch für List. mon. Typ 1 bzw. eine Teilkomponente von Ag 5 spezifisch für List. mon. Typ 4b; sie sind auch - neben dem gruppenspezifischen Hauptanteil von Ag 5 - in den entsprechenden Kulturrückständen "synthet. Nährmed." nachweisbar.

Bb) Antigenvergleich Listerien- Staphylokokken bzw. Enterokokken:

Die für die vorliegende Fragestellung entscheidende Untersuchung liegt in der Prüfung, inwieweit die im homologen Listeria-System auftretenden Präzipitationslinien sich auch mit Anti-Staphylokokken- und Anti-Enterokokkenimmunsereen nachweisen lassen.

Alle Staphylokokken- und Enterokokkenantigenpräparationen wurden gegen Listeria-Antiseren und umgekehrt alle Listeriaantigene gegen Staphylokokken- und Enterokokken-Antiseren getestet; insbesondere wurden die Beziehungen zum entsprechenden homologen Standardsystem ermittelt, um genauere Aussagen über die an Verschmelzung der Präzipitationslinien zu erkennende Identität von Antigenen (bzw. Antikörpern) treffen zu können. Die wesentlichen Ergebnisse dieser zahlreichen Versuchsansätze sind in Tab. 8 und 9 zusammengefaßt und in Abb. 4 an einigen Beispielen illustriert. Daraus ergibt sich, daß wechselseitige Kreuzreaktionen zwischen Listeriaantigenen und Staphylokokken-/Enterokokken-Antiserum bzw. Staphylokokken-/Enterokokkenantigenen und Listeria-Antiserum sich auch im Agardiffusionstest nachweisen lassen. Sie waren stets auf bestimmte Antigene beschränkt, die nach vorherigen Versuchen als Polysaccharide anzusprechen sind. Die Versuche deuten darauf hin, daß das Enterokokken-Antiserum zum kleineren Teil, das Staphylokokken-Antiserum zum größeren Teil mit dem Antigenkomplex 1/2 reagiert; Die Linien 1/2 erwiesen sich praktisch identisch mit a/b bzw. p/q. Damit ist auf ein allen drei Bakterien gemeinsames Partialantigen hingewiesen! Kontrollen mit entsprechenden, vor der Immunisierung gewonnenen Serumproben waren negativ. Eine bevorzugte Kreuzreaktion mit List. mon. Typ 1 war nicht zu erkennen.

Demgegenüber traten P1 3, 4 und 5 nie in diesem System auf; sie konnten auch nicht durch Absättigung der Listeria-Antiseren mit Staphylokokken oder Enterokokken zum Schwinden gebracht oder in ihrer Intensität abgeschwächt werden. Somit erscheinen die den Linien 3, 4 und 5 entsprechenden Listeria-Teilantigene zur immunologischen Erfassung listeriaspezifischer Antikörper am besten geeignet.

Kreuzreaktionen List. mon. und Staphylococcus aureus₃ (AGD):

Staphylokokken-Ag gegen Staphantiserum und List. antiserum:

	List. antiserum reagiert mit	/ reagiert nicht mit
<u>Antigen:</u> KH, Seeliger Staph. (NaClFo)	b	d
KH, Kwap. Staph. (NaClFo)	ab	cd
Glycinlysate Staph. (NaClFo)	b	d

Alle im homologen System negativen Staphylokokken antigene präzipitieren auch nicht mit Listeriaantiserum.

Listeria-Ag gegen List. antiserum und Staph. antiserum:

	Staph. antiserum reagiert mit	/ reagiert nicht mit
<u>Antigen:</u> KH, Seeliger List. 1/4b (NaClFo)	größtem Teil v. 1/2	(3) 5
KH, Lancefield List. 1/4b (NaCl Dato)	größtem Teil v. 1/2	(5)
Glycinlysate List. 1/4b (BouillFo)	größtem Teil v. 1/2	3 (4) 5

Alle im homologen System negativen Listeriaantigene präzipitieren auch nicht mit Staph. antiserum.

Listeria-Ag und Staphylokokken-Ag gegen Listeriaantiserum:

	identisch	/ isoliert
<u>Antigen:</u> KH, Kwap. Staph. + Glycinlys.		
List. 1/4b	a/b = 1/2	3 (4) 5
KH, Kwap. Staph. + Özgen		
List. 1/4b	a/b = 1/2	3 (5)
KH, Seeliger Staph. + Glycinlys.		
List. 1/4b	b = 2	3 (4) 5

Listeria-Ag und Staphylokokken-Ag gegen Staph. antiserum:

<u>Antigen:</u> KH, Seeliger Staph. + Glycinlys.		
List. 1/4b	b = 2	1, d
Glycinlysate Staph. + Glycinlys.		
List. 1/4b	b = 2	1, d

Tab. 8 Im wechselseitigen Ansatz Listeria-/Staphylokokken-Antiserum gegen Listeria- bzw. Staphylokokkenantigen und umgekehrt Listeria-/Staphylokokkenantigen gegen Listeria- bzw. Staphylokokken-Antiserum sind kreuzreagierende (an 1. Stelle aufgeführt) und listeria- bzw. staphylokokkenspezifische (an 2. Stelle aufgeführt) Antigene ermittelt worden.

- keine Reaktion

() Präzipitationslinie nur schwach ausgeprägt

Kreuzreaktionen List. mon. und Enterococcus faecalis L48 (AGD):

Enterokokken-Ag gegen Ent. antiserum und List. antiserum:

<u>Antigen:</u>		<u>List. antiserum</u>	<u>reagiert nicht mit</u>
		<u>reagiert mit</u>	
KH, Lancefield Ent. (NaClFo)		p/q	(o) r
60 % (NH ₄) ₂ SO ₄ (NaClFo) Ent.		p/q	-
Glycinlysate Ent. (NaClFo)		p/q	-
KH, Seeliger Ent. (NaClFo)		p/q	-

Alle im homologen System negativen Enterokokkenantigene präzipitieren auch nicht mit Listeria antiserum.

Listeria-Ag gegen List. antiserum und Ent. antiserum:

<u>Antigen:</u>		<u>Ent. antiserum</u>	<u>reagiert nicht mit</u>
		<u>reagiert mit</u>	
KH, Seeliger List 1/4b(NaClFo)		Teil v. 1/2	(3) 5
KH, Lancefield List 1/4b(NaCl			
Dato)		Teil v. 1/2	-
Glycinlysate List. 1/4b (Bouill. Fo)		Teil v. 1/2	3 (4) 5

Alle im homologen System negativen Listeria antigene präzipitieren auch nicht mit Enterokokken antiserum.

Listeria-Ag und Enterokokken-Ag gegen Listeria antiserum:

<u>Antigen:</u>		<u>identisch</u>	<u>/</u>	<u>isoliert</u>
KH, Lancefield Ent. + KH,				
Seeliger List. 1/4b		(p/q = Teil 1/2) ?		3 5
Glycinlysate Ent. + Glycinlys.				
List 1/4b		(p/q = Teil 1/2) ?		3 (4) 5

Listeria-Ag und Enterokokken-Ag gegen Ent. antiserum:

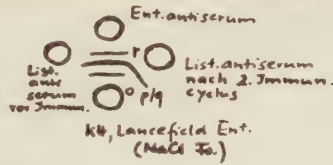
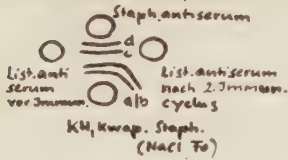
<u>Antigen:</u>		<u>identisch</u>	<u>/</u>	<u>isoliert</u>
KH, Seeliger Ent. + Glycinlysate				
List. 1/4b		(p/q = Teil 1/2) ?		
Glycinlysate Ent. + Glycinlysate				
List 1/4b		(p/q = Teil 1/2) ?		(r)

Tab. 9

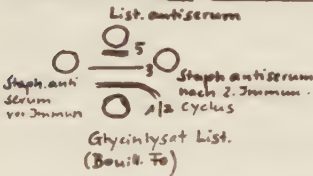
Im wechselseitigen Ansatz Listeria-/Enterokokken-Antiserum gegen Listeria- bzw. Enterokokkenantigen und umgekehrt Listeria-/Enterokokkenantigen gegen Listeria bzw. Enterokokken-Antiserum sind kreuzreagierende (an 1. Stelle aufgeführt) und listeria- bzw. enterokokkenspezifische (an 2. Stelle aufgeführt) Antigene ermittelt worden.

- keine Reaktion
- () Präzipitationslinie nur schwach ausgeprägt
- ? Identität der Präzipitationslinien wahrscheinlich

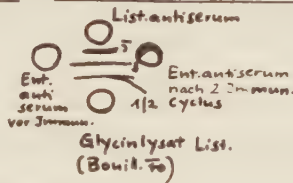
1. Staph.-AG gegen Staph.-u. List.-antiserum 1. Ent.-AG gegen Ent.-u. List.-antiserum



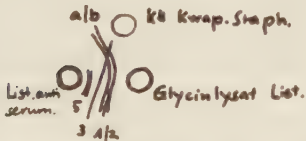
2. List.-AG gegen Staph.-u. List.-antiserum



2. List.-AG gegen Ent.-u. List.-antiserum



3. List.-u. Staph. AG gegen List.-antiserum



4. List.-u. Staph. AG gegen Staph. antiserum



5. List.-AG gegen List., Staph.-u. Ent.-Antiserum

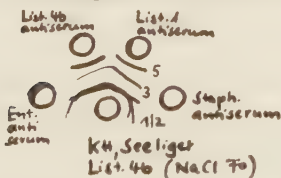


Abb. 4 Gezeigt werden einige der verschiedenartigen wechselseitigen Versuche im heterologen System mit Listeria-, Staphylokokken-, Enterokokkenantigenen und Listeria-, Staphylokokken-, Enterokokken-Antiserum, die zur Ermittlung kreuzreagierender bzw. spezifischer Antigene durchgeführt worden sind. Listeriaantigen 1/2 wird zum größeren Teil von Staphylokokken-, zum kleineren Teil von Enterokokken-Antiserum präzipitiert; es scheint in seinen Hauptkomponenten identisch mit Staphylokokkenantigenen a/b bzw. Enterokokkenantigenen p/q. (Letzteres zeichnerisch nicht wiedergegeben)

C) Mikropräzipitationsteste:

Die Ergebnisse der Agargeldiffusionsteste wurden zum Teil im Kapillartest überprüft. Die positiven Versuche wurden bestätigt; einige der negativen zeigten - durch die größere Empfindlichkeit des Verfahrens bedingt - positive Reaktionen ("TCE List. 4b"; "KH-Kwap. List. 1 und 4b"; "Fuller Staph. "). Die zusätzlich positiven Ergebnisse gaben jedoch keine weiteren Anhaltspunkte hinsichtlich der im Ouchterlony-Test bereits festgestellten Spezifität der einzelnen Linien. Auf eine tabellarische Zusammenfassung der Befunde wurde deshalb verzichtet.

D) Ergebnisse der elektrophoretischen und immunoelektrophoretischen Analysen:

Ergänzend zur Analyse im Agargeldiffusionstest, bei dem ein Antigengemisch auf Grund der unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeit seiner Einzelkomponenten zerlegt wird, sollte die Methode der Immunoelektrophorese angewandt werden, bei der vorwiegend Unterschiede der Ionenbeweglichkeit die Trennung bestimmen. Zur Orientierung wurde zunächst "Glycinlysate List. 1 und 4b" elektrophoretisch aufgespalten und mit Hilfe verschiedener Reagentien auf seinen Gehalt an Protein, Polysaccharid bzw. Glycoprotein untersucht. Es stellte sich (Abb. 5) eine schmale Eiweißzone im Präalbumin-, eine breite im α_1 - α_2 -Bereich dar. Die Polysaccharidfärbung zeigte ebenso wie die Glycoprotein-färbung ein schmales Band im α_2 -Bereich. Typendifferenzen waren nicht zu erkennen.

Anschließend wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen (elektrische Spannung und Stromstärke, Zeit) Immunoelektrophoresen mit einigen Bakterienextrakten im homologen und heterologen System durchgeführt (Abb. 5).

Die einzelnen Linien im Ansatz Listeria-Glycinlysate/Listeria-Immunsereum waren nicht regelmäßig reproduzierbar mit Ausnahme einer Doppellinie im α_2 -Bereich, die sich auch - an gleicher Stelle - mit Polysaccharidextrakten bzw. Polysaccharide mitfärbenden Präparationen aus Listerien ("KH nach Lancefield, "KH nach Seeliger") nachweisen ließen. (Die Beziehungen zu den Ergebnissen der Polysaccharid/Glycoprotein-färbung des elektrophoretisch getrennten Glycinlysats sind offenkundig!). Vermutlich handelt es sich dabei um Ag 1/2. Die Zugehörigkeit der weiteren Präzipitationslinien der Immunoelektrophorese zu denen der Agargeldiffusion konnte nicht sicher ermittelt werden. Andere Mengenverhältnisse von Antigen - es wurde nur in der im AGD bewährten Konzentration getestet - zu Antikörper können infolge des Zonenphänomens eine Präzipitation verhindern, umgekehrt kann - wie bereits erwähnt - ein im Agargel als einheitlicher Komplex diffundierendes Antigengemisch im elektrischen Feld gespalten werden

Ergebnisse der elektrophoretischen und immunoelektrophoretischen

Analysen:

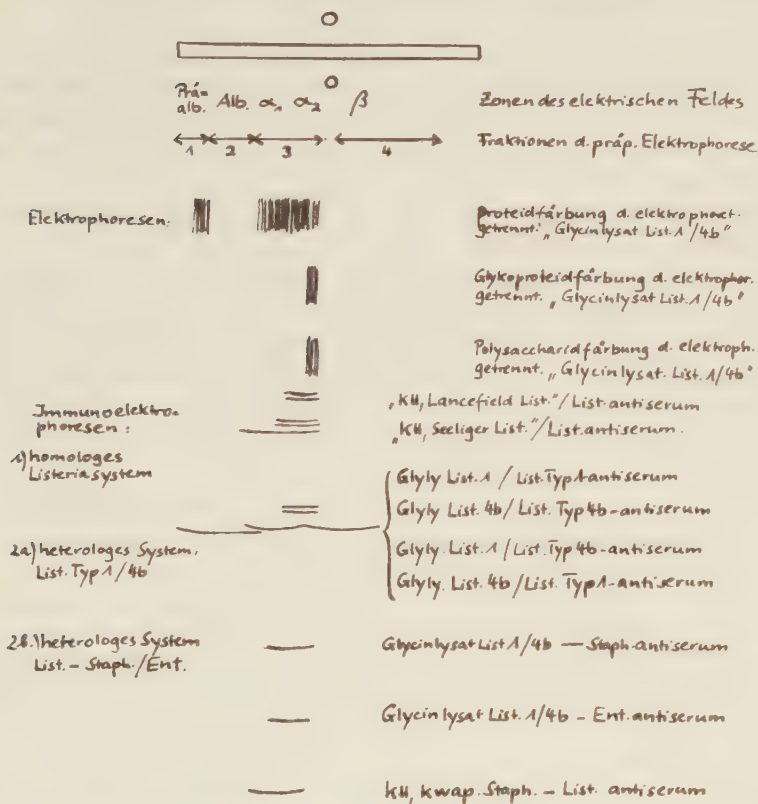


Abb. 5 Es sind die Eiweiß, Glycoprotein bzw. Polysaccharid erfassenden Farb- reaktionen des elektrophoretisch aufgetrennten Glycinlysats List. mon. Typ 1 bzw. Typ 4b wiedergegeben. Gleiche Präzipitationsfiguren der Immunoelektrophorese im wechselseitigen Ansatz List. mon. Typ 1/4b- Antigen und List. mon. Typ 1/4b-Antiserum weisen auf Gruppenspezifität der Listeria-Präzipitogene hin. Das Auftreten der einzelnen Prä- zipitationslinien variiert mit Ausnahme der Doppellinie in der Alpha₂- Zone ("KH nach Lancefield", "KH nach Seeliger", "Glycinlysats"). Kreuzreaktionen Listeriaantigen/Staphylokokken-Enterokokken-Anti- serum lassen sich in der selben Zone, jedoch nur als einfache Linie nachweisen, desgleichen - etwas zur Alpha₁-Zone verschoben - im Sy- stem Staphylokokkenantigen/Listeria-Antiserum.

Insgesamt ließ sich jedoch die ausgeprägte Gruppenspezifität der *Listeria*-antigene bestätigen; die im Agargeldiffusionstest beobachteten Typendifferenzen (Ag 4; Teilkomponente von Ag 5) waren nicht zu erkennen.

Auch Kreuzreaktionen ließen sich nachweisen. Staphylokokken- und Enterokokken-Antiserum ergaben im Ansatz gegen das elektrophoretisch aufgetrennte Glycinlysate List. 1 bzw. List. 4b je eine Präzipitationslinie im α_2 -Bereich. Unterschiede hinsichtlich einer bevorzugten übergreifenden Reaktion speziell des Staphylokokken-Immunsersums mit *Listeria*-antigenen bzw. der Staphylokokken- und Enterokokken-Immunsere mit einem bestimmten *Listeria*-Typantigen ließen sich nicht feststellen. Das Auftreten nur einer einfachen statt doppelten Linie wie im homologen *Listeria*-System jedoch weist erneut darauf hin, daß nur ein Teil von Ag 1/2 mit dem Fremdserum kreuzreagiert. Interessanterweise präzipitierte im umgekehrten Ansatz das *Listeria*-Antiserum eine Komponente des elektrophoretisch aufgespaltenen Antigens "KH Kwap. Staph." an ähnlicher Stelle in ähnlicher Form, eine Tatsache, die die Identität einer Antigenkomponente in "Glycinlysate List. 1/4b" mit einer Antigenkomponente in "KH Kwap. Staph." wahrscheinlich macht.

3. Versuche zur Fraktionierung des Glycinlysats

Da das *Listeria*-spezifische, Typ 1 und 4b gemeinsame Antigen 3 wahrscheinlich ein Protein darstellt, wurden Versuche unternommen, es aus "Glycinlysate List. 4b" mit den üblichen Methoden der Eiweißfraktionierung isoliert darzustellen (fraktionierte Salzfällung, Gelfiltration, Ionenaustauscherchromatographie und präparative Elektrophorese).

3a) Ergebnisse der Salzfällung mit Na_2SO_4 bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

Eine exakte Fraktionierung war technisch schwierig, da die anfangs auftretenden Trübungen durch Zentrifugieren zwar erfaßt werden konnten, aber eine für den Agargeldiffusionstest zu geringe Sedimentmenge ergaben, so daß eine exakte tabellarische Festlegung der Fraktionen bei bestimmten Salzkonzentrationen nicht möglich ist. Aus wiederholten Versuchsansätzen ging hervor, daß bei niedriger Salzkonzentration (etwa 30-40%) zunächst Antigen 3, möglicherweise auch Spuren von Antigen 5-Komponenten erfaßt wurden, Teile der Antigengruppe 1/2 konnten erst mit höheren Salzkonzentrationen gefällt werden, waren aber vor allem zusammen mit Antigen 5-Anteilen in dem durch Lyophilisation eingegangenen über-

stand einer 75-80% Ammoniumsulfatfällung nachweisbar. Infolge mangelnden Auflösungsvermögens im Agargeldiffusionstest war nicht zu ermitteln, aus welcher Anzahl verschiedener Antigenkomponenten die Gruppen 1/2 und 5 zusammengesetzt sind bzw. in welchem Ausmaß sie als einheitliche Glycoproteinantigene gefällt werden oder als dissoziierte Polysaccharidantigene in Lösung bleiben. Das Verhalten von Ag 3 und Ag 5-Komponenten macht wieder deren Proteincharakter wahrscheinlich.

3b) Gelfiltration mit Sephadex G 200:

Die Gelfiltration trennt die Stoffe eines Gemisches auf Grund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße und der sich daraus ergebenden unterschiedlichen Filtrationsgeschwindigkeiten. "Glycinlysate List. 4b" sowie das wieder in Lösung gebrachte Sediment einer 75% Ammoniumsulfatfällung desselben Glycinlysats zeigen ähnliche Kurvenbilder; zwei deutlich gegeneinander abgesetzte Maxima (Abb. 6). Fraktion 1 und 2 enthalten, wie aus dem Ansatz mit Glycinlysate hervorgeht, jeweils Antigen 3 und 5; Fraktion 1 gegen Fraktion 2 getestet zeigt Verschmelzung der Antigenlinien 3, doch Spornbildung bei Antigen 5, was die aus anderen Versuchen angenommene Komplexnatur des Antigens 5 beweist. Das Fehlen von Ag 1/2 in beiden Fraktionen konnte auch indirekt durch die ausbleibende Reaktion mit Staphylokokken- und Enterokokken-Antiserum wahrscheinlich gemacht werden. Fraktion 3 ergab keine sichtbare Präzipitation. Immunelektrophoretisch verhielten sich alle drei Fraktionen negativ oder so schwach positiv, daß die Versuche keine klare Deutung zuließen.

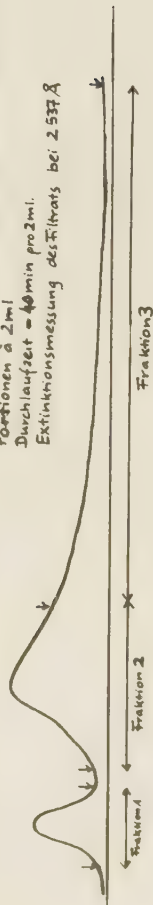
3c) Ionenaustauscherchromatographie mit DEAE- und CAM-Zellulose:

Die Ionenaustauscherchromatographie mit DEAE- oder CAM-Zellulose ermöglicht die Trennung einzelner Stoffe eines Gemisches auf Grund ihres unterschiedlichen pK -Wertes. Die Antigenanalyse der einzelnen Fraktionen ist Abb. 7 (DEAE) und Abb. 8 (CAM) zu entnehmen. Antigen 3 zeigt übereinstimmendes Verhalten; eine starke Fixierung an Zellulose bei alkalischem pH , eine schwache Fixierung bzw. leichte Eluierbarkeit bei saurem pH -Wert. In fast allen Fraktionen sind Komponenten des Antigen-5-Komplexes nachweisbar, was für dessen Heterogenität spricht. Die immunelektrophoretischen Analysen zeigten keine verwertbaren Reaktionen. Die Tatsache, daß Ag 1/2 in keiner Fraktion mehr auftaucht, kann durch ausgebliebene Fixierung oder mangelhafte Elution gedeutet werden. Sie könnte aber auch durch eine Verteilung von Ag 1/2

Gelfiltration Sephadex G200

1) Glycylsart List 4b

Puffer: 0,15M NaCl + 1T 0,15M Phosphatpuff. pH 7,2
 Portionen à 2ml
 Durchlaufzeit = 40min pro 2ml.
 Extinktionsmessung des Filtrates bei 2537 Å



2) Sed. 75% (NH₄)₂SO₄ des Glycylsarts List 4b

Durchlaufzeit 25min pro 2ml
 Sonst wie oben.

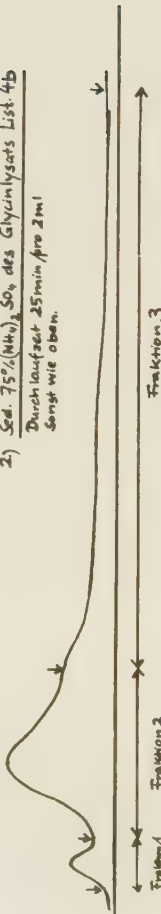


Abb. 6

Anhand kontinuierlicher Extinktionsmessung des Filtrates bei 2537 Å wurden 3 Fraktionen (durch Pfeile markiert) gesammelt und im AGD geprüft, Ag 3 ist in Fraktion 1 und 2 enthalten, Ag 5 zum größeren Teil in Fraktion 1, zum kleineren Teil in Fraktion 2 (Spornbildung).

- keine Reaktion

auf die verschiedenen Fraktionen und damit hervorgerufenen Konzentrationschwund bedingt sein. (Letzteres gäbe gleichzeitig eine Erklärung für das fehlende Erscheinen von Ag 1/2 in den Sephadex-Fractionen). Da die Extinktionsmessung bei 2537 Å erfolgt war, wurde bei der Zusammenfassung der Eluat- bzw. Filtratportionen zu Fraktionen nicht spezifisch Polysaccharide erfaßt. Mittelbar ließe sich daraus auf die Polysaccharidnatur von Ag 1/2 schließen.

Die Ergebnisse der Gelfiltration sowie der Ionenaustauscherchromatographie zeigen, daß eine Stofftrennung nach physikalisch-chemischen Gesichtspunkten sich nicht mit einer immunologischen Fraktionierung decken muß. In fast allen Fraktionen konnten die selben Komponenten des immunologisch nicht derart heterogenen Antigen 5-Komplexes erfaßt und innerhalb der selben Fraktion (Sephadex Fraktion 1 und 2, DEAE Fraktion 5, CAM Fraktion 2) konnten Ag 3 und 5 gleichzeitig nachgewiesen werden.

Eine Erklärung hierfür gibt die Tatsache, daß ein immunologisch sich einheitlich verhaltendes Antigen als Makromolekül unterschiedlichen pK-Wertes bzw. unterschiedlicher Molekülgröße (z. B. verschiedene Polymerisationszustände) vorliegen kann.

3d) Präparative Elektrophorese:

Die oben angegebenen Ergebnisse der elektrophoretischen und immunoelektrophoretischen Analyse waren richtungsweisend für die Begrenzung der einzelnen Fraktionen: Abb. 5. Wie dem färberischen Verhalten sowie immunologischen Reaktionen des elektrophoretisch getrennten Glycinlysats mit heterologen Enterokokken- und Staphylokokken-Antiseren nach zu erwarten war, enthält Fraktion 3 das kreuzreagierende Antigen 1/2 (Abb. 9).

Anionenaustauschromatographie mit DEAE-Zellulose
 Glycylisat List mon. Typ 4b

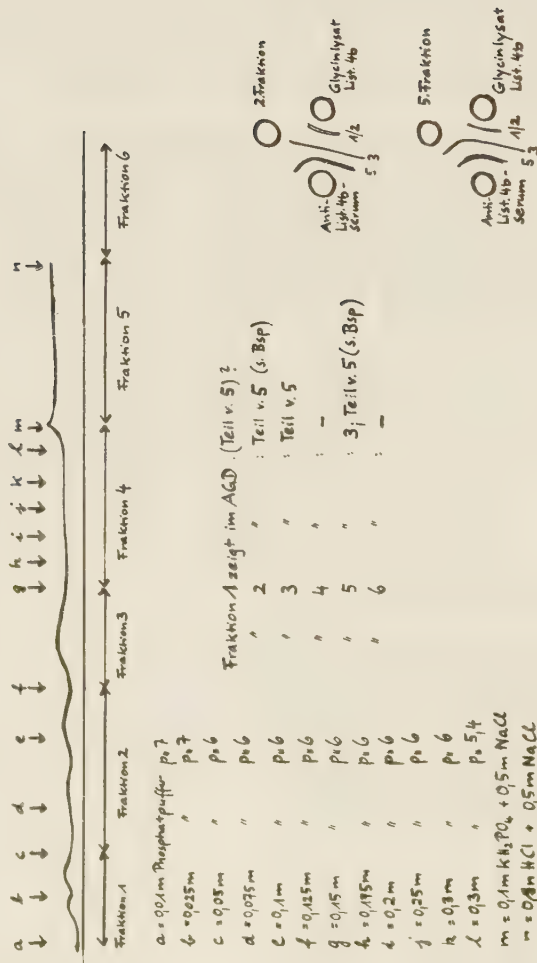


Abb. 7

Anhand kontinuierlicher Extinktionsmessung des Eluats bei 2537 Å wurden 6 Fraktionen (durch Pfeile markiert) gesammelt und im AGD geprüft. Die meisten Fraktionen enthalten Teilkomponenten von Ag 5; Fraktion 5 zusätzlich Ag 3.

↓ Pufferwechsel

— keine Reaktion

(Teil v. 5): schwach ausgeprägte Präzipitationslinie, Identität mit P1 5 fraglich.

Ergebnisse der präparativen Elektrophorese (AGD)

1. Fraktion: —

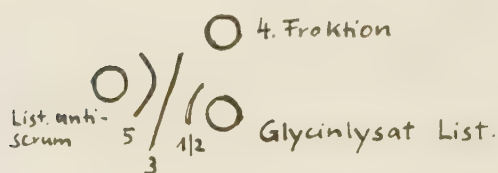
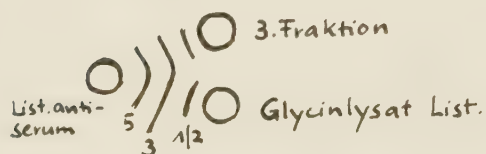
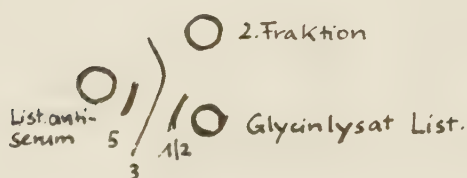


Abb. 9

Zur Position der einzelnen Fraktionen siehe Abb. 5

- keine Reaktion

In der 2. Fraktion ist Ag 3 isoliert dargestellt; die 3. Fraktion enthält neben Ag 3 und 5 die kreuzreagierende Antigengruppe Ag 1/2

Antigenkomplex 5 tritt wieder in mehreren Fraktionen auf (Fraktion 3 und 4). Mit Fraktion 2 ist die isolierte Darstellung von Antigen 3 geglückt, wenn auch nicht quantitativ; ein Teil findet sich noch in Fraktion 3.

4) Versuche mit 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sediment von Glyly. List. 4b' (KBR, Boydentest, Middlebrooktest) bzw. "synthet. Nährmed. List. 1" (Boydentest):

Das durch 50 % Ammoniumsulfatfällung mit Antigen 3 und Teilkomponenten von Antigen 5 angereicherte, jedoch auch geringe Mengen Antigen 1/2 enthaltende Glycinlysate List. 4b wurde als Antigen für verschiedene serologische Tests verwendet. Es wird im folgenden einfachheitshalber mit Glycinlysate bezeichnet. Ein von Girard (37, 39) Njoku-Obi u. a. (81, 82) beschriebenes Hämolyysin wurde in diesem Bakterienextrakt nicht beobachtet, so daß dem Verfahren der KBR und indirekten Hamagglutination nichts im Wege stand. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 niedergelegt. Bei Verwendung desselben Antigenmaterials in verschiedenen serologischen Testverfahren sind qualitative und quantitative Differenzen der entsprechenden Endtiter durch unterschiedliches Ausmaß, in dem die Einzelkomponenten des Antigengemisches zur Reaktion gelangen, und durch unterschiedliche Empfindlichkeit der jeweiligen Testmethoden bedingt. In der Komplementbindungsreaktion sind alle Teilkomponenten nebeneinander gleich wirksam; demnach bestimmen - etwa im Verhältnis ihrer Konzentration im Bakterienextrakt - die homolog und heterolog reagierenden Teilantigene den Reaktionsausfall; letztere bedingen die Kreuzreaktionen im Staphylokokken- und Enterokokken-Antiserum. Im Middlebrook-Test dagegen werden durch die Sensibilisierung der Hammelblutkörperchen (HBK) elektiv Polysaccharide erfaßt, was gemäß der Interpretation der Versuche im Agargel eine ausgesprochene Anreicherung der kreuzreagierenden Teilantigene bedeutet. Erwartungsgemäß liegen die Titer der Staphylokokken- und Enterokokken-Antiseren reaktiv und absolut höher als in der KBR. (Das zur Kontrolle eingesetzte sterile rabbit serum reagierte praktisch nicht). Demgegenüber ermöglicht die beim Boydentest durchgeführte Tanninbehandlung der Hammelblutkörperchen eine ausschließliche Absorption von Eiweiß. Unter der Voraussetzung, daß nur Polysaccharide nicht, aber Proteine heterolog reagieren, muß das im Boydentest zur Reaktion kommende Eiweißantigen die Spezifität des Tests gewährleisten. Trotz hoher Empfindlichkeit des Verfahrens (70, 150, 151) sind keinerlei Kreuzreaktionen festzustellen; während die Listeria-Immunsere Titerhöhen bis zu 1:160 000 (mit frischem Listeria-Glycinlysate-Antigen) aufweisen, lassen die Staphylokokken- und Enterokokken-Immunsere jegliche Reaktion vermissen. Damit bestätigen diese Ergebnisse die aus bisherigen Untersuchungen gezogene Schlußfolgerung, es handle sich bei den kreuzreagierenden Listeria-antigenen um Polysaccharide, bei den spezifisch reagierenden Antigenen um Pro-

Ergebnisse

- 1) KBR mit frisch, 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sed. v. "Glycinlysatsat"
List. 4b (Kältebindung)
- 2) Middlebrook-test mit frisch "50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sed. v.
Glycinlysatsat List. 4b"
- 3) Boydentest mit
a) frisch, "50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sed. v. Glycinlysatsat List. 4b"
b) 2 Mon. gelagert, "50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sed. v. Glycin-
lysatsat List. 4b"
- c) "synthet. Nährmed. List. A"

Antiserum		1) KBR	2) Middle- brooktest	Boydentest		
				3a)	3b)	3c)
List. 1	(K7)	2048	1536	40960	640	640
List. 1	(K8)	1024	1536	81920	2560	1280
List. 4b	(K6)	1024	3072	163840	1280	640
List. 4b	(K9)	512	3072	81920	640	1280
Staph.	(K4)	8	96	-	-	-
Ent.	(K3)	16	12	-	-	-
Ent.	(K5)	8	96	-	-	-
neg. "pooled"						
Kaninchenserum		4?	6?	-	-	-

Tab. 10 Angegeben ist der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung die 100 % Hämolysehemmung (1) bzw. komplette Agglutination (2, 3) ergab.

- negative Reaktion

? fraglich positive Reaktion in der 1. Serumverdünnung.

Kreuzreaktionen im heterologen System Listeriaantigen/Staphylokokken- bzw. Enterokokken-Antiserum sind in der KBR angedeutet, im Middlebrooktest deutlich ausgeprägt; sie fehlen dagegen vollständig im Boydentest. Starker Titerabfall nach Lagerung des Glycinlysatsantigens. Die Titer mit altem Glycinlysatsantigen und "synthet. Nährmedien"-Antigen sind gleich hoch.

teine. Der Test mit KH-sensibilisierten Hammelblutkörperchen zeigt ausgeprägte, der Test mit EW-sensibilisierten Hammelblutkörperchen keinerlei Kreuzreaktionen. Die Ergebnisse der KBR nehmen eine Mittelstellung ein entsprechend der gleichwertigen Reaktionsfähigkeit der einzelnen Teilantigene.

Diesen Ausführungen nach erfüllt die indirekte Hämagglutination nach Boyden (soweit das eingesetzte Antigenmaterial überhaupt Eiweißantigen enthält) infolge der elektiven Erfassung von Proteinen die Bedingungen eines listeriaspezifischen Tests. Es lag nahe, ein einfacher herstellbares Präparat zu verwenden, wie den Kulturrückstand "synthet. Nährmed. List. 1", der zusätzlich den Vorteil aufweist, außer Bakteriensubstanzen wenig zusätzliche, bei der Sensibilisierung der Blutkörperchen konkurrierende Stoffe (z. B. Nährbouillonbestandteile) zu enthalten. Aus den Versuchen des AGD-Tests geht hervor (Tab. 4, Abb. 3), daß "synthet. Nährmed. List. 1" Ag 5 und das Listeria Typ 1-spezifische Ag 4 enthält; die relative Unempfindlichkeit des Verfahrens schließt jedoch eventuell vorhandene Spuren von Ag 3 oder Ag 1/2 nicht aus. Aus Materialgründen konnte in einer empfindlicheren Methode wie KBR und Middlebrook-Test das Vorhandensein von Ag 1/2 nicht überprüft werden, welches gemäß den oben gegebenen Ausführungen Kreuzreaktionen im Staphylokokken- und Enterokokken-Immunserum hatte hervorrufen müssen. Die Ergebnisse des Boydentests zeigen eindeutig, daß ein listeria-gruppenspezifisches Antigen den Reaktionsausfall bestimmt. Die Ergebnisse der Staphylokokken- und Enterokokken-Antiseren sind negativ, die der einzelnen Listeria Typ 1 und 4b-Antiseren untereinander gleich (= Gruppenspezifität des Antigens), doch insgesamt wesentlich niedriger als die Titer mit dem frisch hergestellten Glycinlysantigen. Andererseits entsprechen sie den Titerhöhen mit 2 Monate lang gelagertem Glycinlysantigen. Da grundsätzlich die optimale Antigenkonzentration in Vorversuchen ermittelt wurde, ist die Ursache für die auffallend niedrigen Titer nicht quantitativ in einer ungünstigen Antigendichte, sondern qualitativ in verschiedenen reaktionsfähigen (Eiweiß-)Antigenen zu suchen. (Ein durch die Seren bedingter Titerabfall schien von vornherein unwahrscheinlich, da er alle 4 Listeria-Typ-Immunseren hätte gleichzeitig und gleich stark treffen müssen. Er konnte durch Vergleiche mit anderen serologischen Untersuchungen ausgeschlossen werden).

Die AGD-Versuche geben Hinweise, daß Ag 5 in "synthet. Nährmed. List. 1" sowie "Glycinlysate List. 4b" vertreten ist, dagegen Ag 3 ausschließlich (oder fast ausschließlich?) im "Glycinlysate". Möglicherweise kommt im gealterten Glycinlysate ähnlich wie im Kulturrückstand überwiegend ein Anteil des Ag 5-Komplexes zur Reaktion, während der hohe Titer im frischen Glycinlysate auf das dort reichlich vorhandene, aber im Kulturrückstand fehlende Ag 3 zurückgeführt werden könnte; mit anderen Worten der Titerrückgang im Glycinlysate

kann durch Zerfall von Ag 3 während der Lagerung bedingt sein. Infolge Materialmangels konnte das gealterte Glycinlysate nicht mehr eingeeengt werden, um im Ouchterlony-Präzipitationstest einen Wirkungsverlust von Ag 3 zu überprüfen. Eine Gegenüberstellung der jeweils zur Sensibilisierung eingesetzten Eiweißkonzentrationen ("Glycinlysate" 0,75 mg EW/cm³ HBK-Suspension - "synthet. Nährmed." 0,45 mg EW/cm³ HBK-Suspension) erlaubt keine sichere Aussage, ob im Glycinlysate mehr Eiweißantigen (= zusätzliches Ag 3) als im "synthet. Nährmed." enthalten ist, da es sich um ungereinigte Präparationen handelt und auch nicht als Antigen wirkendes Eiweiß mit der Biuret-Messung erfaßt wird.

Die Frage nach den eigentlichen, den Reaktionsausfall bestimmenden Antigenen kann somit nicht mit Sicherheit beantwortet werden; vermutlich handelt es sich um eine Kombination von Ag 3 und Komponenten von Ag 5 im frisch hergestellten Glycinlysate, bzw. um Komponenten von Ag 5 im "synthet. Nährmedien" und alten Glycinlysate. Außerdem ist unklar, ob typenspezifische Antigenkomponenten (Pl 4 in "synthet. Nährmed. List. 1", Teilkomponente von Ag 5 in "Glycinlysate List. 4b") im Boydentest eine Rolle spielen. Die Ergebnisse mit Typ 1- bzw. Typ 4b-Antigen zeigen gegenüber *Listeria* Typ 1- und 4b-Antiserum jedenfalls keine auf eine Typendifferenz hinweisende Titerunterschiede.

IV) DISKUSSION:

Übergreifende serologische Reaktionen zwischen Mikroorganismen auch ohne phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen sind seit langem bekannt; ihre Ursache hat man in gemeinsamen Antigenstrukturen (58, 131) gesehen. Sie spielen für die Listeriadiagnostik eine wesentliche Rolle, da sie die Identifizierung von *Listeria*-Antikörpern erheblich erschweren. Die von Beeck (3), Drew (24), Seeliger und Sulzbacher (137) angegebene, von Winblad (171) jedoch nicht beobachtete Kreuzreaktion zwischen *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* konnte in der Agglutinations-, Komplementbindungs- und indirekten Hämagglutinationsreaktion bestätigt werden. Die Antigenanalyse des Ouchterlonytests zeigt die Identität von Staphylokokken- und Listeriateilantigenen unmittelbar. Hinweise auf beiden Keimen gemeinsame Antigenstrukturen gibt auch die Mitteilung von Girard (33), daß "Listeriatoxin" mit "Staphylococcus aureus-Alpha-Antitoxoid" neutralisiert werden kann. Hamon und Peron (49, 50) berichten von einem ähnlichen Aktivitätsspektrum beider Bakterizine - "Staphylococcin" sowie "Monocin"-; Sword (152) von einer durch einzelne *Staphylococcus aureus*-Phagen bewirkte Lysis bei Listerien (jedoch nicht umgekehrt). Die Beobachtungen von Welshimer (162, 164), daß mit Staphylokokken immunisierte Kaninchen nach einer einige Wochen später erfolgten Injektion mit Listerien einen Anstieg des Staphylokokkentiters zeigten, kann im Sinne einer anamnestischen Reaktion gedeutet werden, soweit jeder - auch flüchtige - Kontakt mit Staphylokokken zu dieser Zeit ausgeschlossen werden konnte. Lipoidfraktionen aus Listerien allein rufen nämlich - wahrscheinlich über die Stimulation von Monocyten (vergleiche Name des Erregers; - "monocytosis producing agent" - MPA Stanley's (148)) - eine unspezifische Antikörperbildung hervor (34, 35, 149). Möglicherweise ist der eine oder andere in der Literatur beschriebene Fall einer Listeriose mit hohem heterologem Antikörpertiter fälschlicherweise als eine echte Kreuzreaktion gedeutet worden.

Ebenfalls ließen sich übergreifende serologische Reaktionen der Listerien mit Enterokokken, Streptokokken der Gruppe D nach Lancefield, bestätigen (136). Die vorliegenden Versuchsergebnisse deuten darauf hin, daß die den Staphylokokken und Listerien gemeinsame Antigengruppe zumindest teilweise identisch ist mit der den Enterokokken und Listerien gemeinsamen Gruppe ($a/b = 1/2 = p/q$).

Schon Mitteilungen von Fraser (28), Pakula und Walzak (93), Znamirowski (173) über ein Staphylokokken und Streptokokken gemeinsames Antigen, sowie von Harris (51), Kirby (59) und Sachse (124) über eine in der Bevölkerung weit verbreitete und ohne Beziehung zum Antistreptolysintiter stehende positive Reaktion mit Fuller- und anderen Polysaccharidextrakten aus Streptokokken lassen vermu-

ten, daß es ein vielen Keimen gemeinsames Antigen gibt. Auch das Verhalten der Gramfärbung bzw. Penicillinempfindlichkeit spricht für eine chemisch-strukturelle Ähnlichkeit unter den entsprechenden Mikroorganismen (74). Neter u. a. schließlich berichten über ein in den meisten grampositiven Bakterien nachweisbares "non species specific (NSS) antigen of the Rantz-type" (114, 115) und sein Vorkommen auch bei *Listeria monocytogenes* Typ 1 und Typ 4b (79), sowie bei Staphylokokken (78, 80). Weitere Hinweise sind von vergleichenden chemischen und immunologischen Analysen der Zellwand- und Zelleibpräparationen von Listerien, Staphylokokken und Streptokokken - bzw. von grampositiven Bakterien - zu erwarten. Bisherige Untersuchungen zeigten das als Voraussetzung dafür zu fordernde Vorkommen gleicher oder nah verwandter chemischer Stoffe. (Aminozucker, Polyglycerophosphate) (1, 17, 19, 126, 127, 128).

Es wäre denkbar, daß es sich bei der hier beschriebenen Antigengruppe 1/2 zumindest teilweise um das NSS-Antigen handelt, welches selbst nicht einheitlicher, sondern komplexer Natur (40) zu sein scheint. Das labile Verhalten des Rantz antigens im alkalischen, im Gegensatz zu seiner Stabilität im sauren Milieu (78, 79) steht nicht unbedingt im Widerspruch zu dem mutmaßlichen Polysaccharidcharakter (evtl. Lipopolysaccharid) des Antigens 1/2. Dafür sprechen; Hitzestabilität bei der Säureextraktion nach Lancefield; vor allem Reaktionsfähigkeit in der indirekten Hämagglutination nur mit polysaccharid-, nicht mit eiweißsensibilisierten Hammelblutkörperchen; fehlende Extinktion bei 2537 Å(?), keine Fallbarkeit bei niedrigen Salzkonzentrationen bzw. eine Lösungsstabilität bei hoher Salzkonzentration; die mit den Ergebnissen der Polysaccharidfärbung übereinstimmende Lage in der Immunoelktrophorese. Das Ausbleiben einer Präzipitation zwischen der mit Lauge extrahierten Präparation "KH Potel" und Eigen- bzw. Fremdserum ist dagegen nur mit Vorsicht als Hinweis auf eine Labilität des Antigens 1/2 im alkalischen Milieu zu werten, da der negative Reaktionsausfall wohl eher durch die Versuchsbedingungen des Ouchterlony- und Kapillarpräzipitationstests als durch die Zerstörung des Antigens bei der Aufarbeitung verursacht ist. - Schließlich gibt die Gruppenspezifität des Antigenkomplexes 1,2 einerseits, das Vorkommen des Rantz-Antigens bei *Listeria monocytogenes* Typ 1 und 4b (79) andererseits einen weiteren Anhaltspunkt für die Identität des letzteren mit zumindest einem Teilfaktor von AG 1/2.

Möglicherweise kann zusätzlich ein speziell den Staphylokokken und Listerien gemeinsames Antigen angenommen werden, da das Staphylokokken-Immunserum - zumindest im Agargel - mit dem *Listeria*antigen 1/2 mehr Komponenten anzeigt als das Enterokokken-Immunserum. Diese Tatsache entspricht der bei den Routineuntersuchungen gemachten Beobachtung, daß weit häufiger Staphylokokken- als Enterokokkentiter die üblichen serologischen Reaktionen mit *Listeria*antigen überlagern (65, 130).

Die Ergebnisse im Ouchterlony-Präzipitationstest sowie in der Immunelektrophorese geben keinen Anhalt für stärker ausgeprägte Kreuzreaktionen mit *Listeria* Typ 1 als 4b, wie sie den Ergebnissen der Agglutination und KBR (Tab. 1 und 2) zu entnehmen sind; d. h., das Staphylokokken-Immuneserum präzipitiert mit *Listeria* Typ 1 - sowie Typ 4b-Antigen gleichviel Teilkomponenten von AG 1/2, ebenso das Enterokokken-Immuneserum, wenn auch insgesamt weniger (AGD). Demgegenüber beobachteten Beeck (3), Seeliger und Sulzbacher (137) im System Staphylokokken-Listerien wechselseitige, doch ausschließliche Kreuzreaktionen mit *Listeria* Typ 1 (2 und 3), nicht dagegen mit Typ 4b, während sich nach Mitteilung von Seeliger (136) im System Enterokokken-Listerien je nach Enterokokkenstamm übergreifende Reaktionen bevorzugt mit *Listeria* Typ 1 oder 4b nachweisen lassen. (Ergebnisse der Agglutinations- und Komplementbindungsreaktion mit Kaninchenserum; analoge Kreuzreaktionen waren jedoch nach jenen Autoren in der Präzipitation mit Polysaccharidextrakten überhaupt nicht bzw. nicht regelmäßig oder nur in einer Richtung nachweisbar). Ein Vergleich dieser Befunde mit der Häufigkeit speziell "unspezifischer O₁-Agglutinine" beim Menschen (7, 69 u. a.) erscheint nicht zweckmäßig, da bei Humanserum zumindest für die Reaktion im *Listeria*-Widal Antikörper anderer Spezifität (γM-Immunglobuline, 19S Antikörper) mit verantwortlich zu machen sind, die bei Kaninchenserum in dieser Form keine Rolle spielen (130).

Eine Angabe über die Zugehörigkeit der hier ermittelten typen- und gruppenspezifischen sowie kreuz- und nicht kreuzreagierenden Antigene zu den O- und H-Faktoren Paterson's (95, 96, 135, 140) ist nicht möglich, da nicht gesagt werden kann, ob die betreffenden Antigene an der Körperoberfläche oder im Zellinnern, ob an der Geißel oder am Zelleib lokalisiert gewesen sind. (Das Vorhandensein von Geißelantigenen im Glycinlysat kann als gesichert angenommen werden, da der Extrakt aus einwandfrei begeißelten Bakterien (s. Material und Methoden II, 2ß) gewonnen wurde). Allein die kleine Anzahl der hier eingesetzten Seren erlaubt keine sichere Interpretation, da "bei der Immunisierung von Tieren der gleichen Art mit dem gleichen Antigen mit der Bildung von Immuneseren ungleicher Wirkungsbreite" (Landsteiner 64) zu rechnen ist (120, 147). Es konnten lediglich Typengleichheit der H-Agglutinine, Typendifferenzen der O-Agglutinine (96, 135, 140 u. a.), sowie das "Übergreifen typenspezifischer Präzipitogene" (Potel 104) (außerdem Tubylewicz 156, 157, 158, 159) bestätigt werden. Demgegenüber ist nach Metzger und Smith (72) eine einwandfreie Typendifferenzierung der Listerien mittels Salzsäureextrakten im Agargel-diffusionstest möglich. Allerdings wurden Impfstoff und Präzipitinogen aus Bakterien gewonnen, welche auf besonderen, die Kapselbildung fördernden Nährböden gezüchtet waren. Zudem soll wegen der erwähnten individuellen Schwan-

kungsbreite nicht jedes Immuns serum zur Typendiagnose geeignet sein.

Die hier beschriebenen Kreuzreaktionen sind für die allgemeine praktische Serologie von grundlegender Bedeutung; sie erschweren vor allem die Listeriose-Diagnostik. "It may not be overly pessimistic to suggest that conventional serologic methods - agglutination, precipitation, complement fixation and indirect hemagglutination - will hardly offer a way out of this dilemma" (82).

Andere serologische Methoden wurden vorgeschlagen, haben sich aber nicht durchgesetzt, weil sie ebenfalls Kreuzreaktionen zeigten, zu umständlich oder für eine Frühdiagnose ungeeignet waren (Antihämolysebestimmung (81, 83), Intracutantest (53, 108, 112, 116, 172 u. a.), Wachstumsprobe nach Wellmann (107), Antigenfixationstest (82), Opsonocytophagictest (56)). - Durch die gleichzeitige Anwendung mehrerer "herkömmlicher" Nachweismethoden können verschiedene, komplementbindende, agglutinierende und präzipitierende Antikörper erfaßt und so die Sicherheit der serologischen Untersuchung erhöht werden. Es besteht kein Grund zur Annahme, daß die verschiedenen Ergebnisse die Mitwirkung heterologer Antikörper in gleichem Ausmaß reflektieren, insbesondere erscheint die KBR wesentlich spezifischer als die Agglutination (130).

Eine sichere Auswertung wird aber nur dasjenige Verfahren erlauben, bei dem ausschließlich listeriaspezifische Antigenkomponenten den Reaktionsausfall bestimmen. Diese Forderung ist wahrscheinlich nur durch die Isolierung spezifischer Antigene zu erfüllen, da die andere Möglichkeit - Absorption des Serums mit heterologem Antigen - bei kompletter Kreuzreaktion den zumindest teilweisen Verlust von Listeriaantikörpern herbeiführt. Ein solches spezifisches Antigen soll Antikörper erfassen, welche möglichst frühzeitig im Verlaufe einer Listeriainfektion und in genügendem Umfange gebildet werden. Die vom praktischen Gesichtspunkt aus zu stellenden Anforderungen beziehen sich auf Gruppenspezifität des Antigens, stabiles Verhalten und einfaches Herstellungsverfahren.

Seeliger erwähnt, daß bisher keine heterogenetischen Antikörper gegen Geißelantigene der Listerien nachgewiesen seien (136, 140). Das steht im Widerspruch zu unseren Ergebnissen der H-Agglutination (Tab. 1); außerdem konnten wir wiederholt Fälle mit isoliert hohem H_4 -Agglutinationstiter beobachten, die nach Staphylokokkenabsorption ausblieben. (130) Auch Girard (36) hält isoliert hohe H-Agglutinationstiter (Typ 1) für unspezifisch. Die alleinige Ermittlung des H-Titers erscheint zudem für die Praxis der Listeriose-Diagnostik ungeeignet, da der Antigenreiz des H-Antigens sehr unterschiedlich ausgeprägt ist (Czwalina 20) und bei einer Körpertemperatur von 37°C mit einer schwachen Geißelbildung der

Listerien gerechnet werden muß (30, 45, 67, 95).

Auf Grund unserer Versuche erscheinen nur Eiweißantigene - also Antigen 3 und ein Teilfaktor des Ag 5-Komplexes - die Bedingungen eines listeriaspezifischen serologischen Tests zu erfüllen. Die weiteren Eigenschaften von Ag 3 genügen den anderen, oben erwähnten Anforderungen hinreichend; Es erscheint zur Erfassung von Frühantikörpern geeignet, da - im Tierversuch - korrespondierende Antikörper bereits in den nach dem ersten Immunisierungszyklus gewonnenen Seren nachgewiesen werden konnten. (Drew(24), Potel(104) und Seeliger(140) betonen demgegenüber ein relativ spätes Auftreten von Präzipitinen bzw. Hämagglutininen). Die Dichte der dem Ag 3 entsprechenden Präzipitationslinie P13 war im Vergleich mit anderen am stärksten und könnte u. a. durch eine hohe Antikörperkonzentration als Folge eines kräftigen Antigenreizes bedingt sein. (Dies Verhalten allein ist für eine Kreuzreaktion nicht typisch und spricht von vornherein für die Spezifität des Antigens). Weiterhin zeigt Ag 3 Gruppenspezifität. Seine Gewinnung und die Erfassung im Agargel waren reproduzierbar, die quantitative Ausbeute (Extraktion mit Glykocoll) relativ groß. Nachteilig ist nur die vermutliche Labilität (Titerdifferenz zwischen frischem und gealtertem Glycinlysat im Boydentest).

Über die Eignung des Ag 5-Komplexes läßt sich nichts Sicheres aussagen. Er scheint neben Polysaccharidfaktoren und typenspezifischen (Typ 4b) Komponenten ein listeria-gruppenspezifisches Eiweiß-Teilantigen zu enthalten, das die Voraussetzung für einen spezifischen serologischen Test erfüllt. Von großem Vorteil ist seine einfache Gewinnung (z. B. in Kulturüberständen); doch mangelndes Auflösungsvermögen im Agargeldiffusionstest erlaubt keine Rückschlüsse, inwieweit dieses Teilantigen zur Erfassung von Frühantikörpern geeignet ist.

Versuche einer isolierten Darstellung des Antigens 3 gelangen mittels präparativer Elektrophorese, nicht dagegen mit Hilfe fraktionierter Aussalzung, Gel filtration oder Ionenaustauscherchromatographie. Vorausgesetzt, daß tanninpräparierte Hammelblutkörperchen ausschließlich Proteine und keine Polysaccharide binden, stellt die Inkubation der in ihrer Oberflächenstruktur veränderten Blutkörperchen mit einem Antigengemisch bereits eine Art Eiweißisolierung dar, welche eine vorhergehende Aufarbeitung des Gemisches weitgehend erübrigt. Ein Vergleich der Ergebnisse der indirekten Hämagglutination mit und ohne tanninpräparierten Erythrocyten spricht dafür. Über das Ausmaß, in dem die einzelnen Eiweißantigene (Ag 3 oder Komponenten des Ag 5-Komplexes) zur Reaktion kommen, kann keine sichere Aussage gemacht werden.

Grundsätzlich scheint mit dem Verfahren der modifizierten indirekten Hämagglutination unter Verwendung eines die Ag 3 und/oder 5 enthaltenen Bakterienextrakts - unabhängig vom Ag 1/2-Gehalt - die Möglichkeit eines listeriaspezifischen serologischen Tests gegeben zu sein, da heterolog wirksame Antigene den hier gewonnenen Ergebnissen nach keinen Proteincharakter haben. Weitere Versuche, das Verhalten anderer im AGD angewandter Präzipitinogene im Boydentest sowie das Verhalten des durch präparative Elektrophorese isolierten Ag 3 mittels anderer serologischer Methoden - wie KBR und Middlebrooktest - zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr unternommen.

Die vorgelegten Ergebnisse beziehen sich lediglich auf Kaninchenimmunsereen, doch solche **am** Tier gewonnenen **Befunde** lassen sich nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse bei der natürlichen Infektion des Menschen übertragen. Es bleibt deshalb die Eignung der vorgeschlagenen indirekten Hämagglutination nach Boyden mit Humanseren vor allem noch hinsichtlich der Spezifität zu prüfen. Weiterhin wäre zu ermitteln, von welcher Antigenpräparation (z.B. Glycinlysat oder Kulturrückstand) auszugehen ist, damit der Test eine diagnostischen Anforderungen genügende Empfindlichkeit aufweist und die frühzeitig im Verlaufe der Erkrankung auftretenden Antikörper erfaßt.

V) ZUSAMMENFASSUNG

Die Reaktionsfähigkeit der von Kulturüberständen, Protein- und Polysaccharidextrakten aus *Listeria monocytogenes* gewonnenen Antigene wurde mittels des Agargeldiffusionstestes im homologen System mit Antiserum *Listeria monocytogenes* Typ 1 und 4b festgestellt. Im heterologen System mit Antiserum *Staphylococcus aureus* b₃ und *Enterococcus faecalis* L48 konnten die einzelnen Präzipitine in kreuz-reagierende Antigene mutmaßlicher Polysaccharid-, und listeriaspezifische Antigene mutmaßlicher Proteinnatur differenziert werden. Aus einem alle Präzipitine enthaltenden Extrakt "Glycinlysat List.4b" wurde versucht, mittels fraktionierter Salzfallung, Gelfiltration, Ionenaustauscherchromatographie und präparativer Elektrophorese ein spezifisches Eiweißantigen zu isolieren. Das Gesamtglycinlysat zeigte im Agargeldiffusionstest, in der Mikropräzipitation, in der Komplementbindungs- und indirekten Hamagglutinationsreaktion (nach Middlebrook) übergreifende Reaktionen mit Staphylokokken- und Enterokokkenantiserum. Dagegen scheint nach Tanninbehandlung der als Antigenträger verwendeten Hammelblutkörperchen eine Absorption von spezifischem Eiweißantigen zu erfolgen, so daß die damit ausgeführte indirekte Hamagglutinationsreaktion die Voraussetzung für einen listeria-spezifischen serologischen Test zu erfüllen scheint. Ähnlich wie Glycinlysat, doch mit niedrigeren Titern, reagieren Kulturüberstände im Boydentest. Die Eignung dieses zunächst nur mit Kaninchenimmunsereen erprobten Verfahrens für medizinisch-diagnostische Zwecke bleibt noch zu prüfen, insbesondere bezüglich Spezifität, Empfindlichkeit und Fähigkeit zur Erfassung von Frühantikörpern.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Armstrong, J. J., Baddiley, J., Buchanan, J. G., Carss, B.:
Nucleotides and the bacterial cell wall.
Nature 181, 1692 (1958)
- 2 Bauer-Hack, K.: Serologische Untersuchungen zur Verbreitung der
Listeriose, *Zbl. Bakt. I. Orig.* 186, 91 (1962)
- 3 Beeck, R.: Inwieweit beeinflussen Staphylokokken-Antigene Seroreak-
tionen auf Listeriose? Inaug. Diss. Bonn (1957)
- 4 Beiser, S. M., Dworetzky, M., Smart, K. M.:
Studies on materials derived from *Staphylococcus*.
IV. Precipitating antibodies to *Staphylococcal* antigens
in human sera. *J. Allergy* 29, 44 (1958)
- 5 Biegeleisen, J. Z. jr.:
Fluorescent antibody studies on *Listeria monocytogenes*.
In: Second Symposium on Listeric infection; ed. by
M. L. Gray, Montana State College, Bozeman 183 (1963)
- 6 Bliss, E. A.: A constituent of peptone broth as a cause of cross reac-
tions with antisera prepared against group C (Lancefield)
hemolytic streptococci. *J. Immunol.* 34, 337 (1938)
- 7 Bock, W.: Versuch einer Auswertung der *Listeria monocytogenes*
Typ 1-Titer im Untersuchungsmaterial des Hygiene-In-
stituts Bonn/Rh. (1954-58). Inaug. Diss. Bonn (1961)
- 8 Boekels, H.: Ein Beitrag zur Agglutinationstechnik mit *Listeria mono-*
cytogenes unter besonderer Berücksichtigung der dabei
optimalen Kochsalzdichte. Inaug. Diss. Gießen (1950)
- 9 Boivin, A., Mesrobian, J., L. Mesrobian:
Technique pour la préparation des polysaccharides mic-
robiens spécifiques. *Compt. rend. heb. Soc. Biol.* 113,
490 (1933)
- 10 Bojsen-Moeller, J.: Studies on the growth and isolation of *Listeria monocyto-*
genes at low temperatures.
In: Second Symposium on Listeric infection; ed. by M. L.
Gray, Montana State College, Bozeman 169 (1963)
- 11 Bornmer, W.: Positive serologische Listeriosebefunde bei verschiedenen
Krankheitsbildern, *Kinderärztl. Praxis* 27, 274 (1959)

- 12 Borduas, A. G., Grabar, P.:
L'Héماغglutination passive dans la recherche des anti-
corps antiprotéiques,
Ann. Inst. Past, 84, 903 (1953)
- 13 Boyden, V. St.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with
tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-
protein sera.
J. Exp. Med. 93, 107 (1951)
- 14 Breed, R. S., Murray, E. G. D. and N. R. Smith:
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,
7th ed, Ballière, Tindall & Cox, LTD. /London (1957)
- 15 Mc Bride, M. E., K. F. Girard:
A selective method for the isolation of *Listeria monocy-*
togenes from mixed bacterial populations.
J. of Lab. a. Clin. Med. 55, 153 (1960)
- 16 Burn, C. G.: Characteristics of a new species of the genus *Listerella*
obtained from human sources,
J. Bact. 30, 573 (1935)
- 17 Mc Carty, M.: The occurrence of polyglycerophosphate as an antigen
component of various grampositive bacterial species,
J. Exp. Med. 109, 361 (1959)
- 18 Castellani, A.: Die Absorption bei gemischter Infektion und die Diagno-
se der letzteren.
Zsch. Hyg. 40, 1 (1902)
- 19 Cummins, C. S., Harris, H.:
The chemical composition of the cell wall in some
grampositive bacteria and its possible value as a taxo-
nomic character.
J. Gen. Microbiol. 14, 583 (1956)
- 20 Czwalina, I.: Untersuchungen über die Brauchbarkeit verschiedener
Listeria monocytogenes-Teste,
Inaug. Diss., Freie Univers. Berlin, Journal Nr. 160 (1956)

- 21 Degen, L.: Zur Serologie und Immunbiologie der Listeriose.
IV. Mitteilung. Ein Lipoproteid als Hapten für die In-
trakutandiagnose der Listeria-Infektion.
Zbl. Bakt. I. Orig. 185, S. 372 (1962)
- 22 Dittebrandt, M.: Application of the Weichselbaum Biuret reagent to the
determination of spinal fluid protein. Amer. J. clin.
Pathol. 18, 439 (1948)
- 23 Donker-Voet, J.: Serological studies on some strains of Listeria monocy-
togenes especially typ IV strains.
in: Listeriosen, herausgegeben von E. Roots und D.
Strauch, Zbl. Vet. Med., Suppl. 1, 37 (1958)
- 24 Drew, R. M.: Occurrence of two immunological groups within the
genus Listeria. Studies based upon precipitation reac-
tions.
Proc. Soc. Exp. Biol. a Med 61, 30 (1946)
- 25 Eveland, W. C.:
a) Demonstration of Listeria monocytogenes in direct
examination of spinal fluid by fluorescent-antibody
technique. J. Bact. 85, 1448 (1963)
- 26 - b) Fluorescent antibody studies on Listeria monocytogenes.
in: Second Symposium on Listeric infection; ed. by M. L.
Gray, Montana State College, Bozeman 186 (1963)
- 27 Flamm, H.: Die patho-histologische Diagnose der Listeriose im Tier-
versuch.
Schweiz. Zs. Path. Bakt. 18, 270 (1955)
- 28 Fraser, K. B.: Antibody in glandular-fever-sera to an antigen common
to Streptococci and Staphylococci.
J. Path. Bact. 67, 301 (1954)
- 29 Friedman, M. E., W. G. Roessler:
Growth of Listeria monocytogenes in defined media.
J. Bact. 82, 528 (1961)

- 30 Fuhs, G.W. u. Seeliger H.P.R.:
Zur Begeißelung von *Listeria monocytogenes*. Elektro-
nenoptische und serologische Untersuchungen. Archiv
f. Mikrobiol. 40, 153 (1961)
- 31 Fuller, A.T.: The formamide method for the extraction of polysaccha-
rides from hemolytic streptococci.
Brit. J. Exp. Path. 19, 130 (1938)
- 32 Gibson, H.J.: A pathogenic diphtheroid bacillus from a fatal case of
meningitis.
J. Path. Bact. 41, 239 (1935)
- 33 Girard, K.F.: Master Thesis, Mc Gill University (1950) cit. n. Seeliger
(140)
- 34 Girard, K.F. and E.G.D. Murray:
The influence of a sustained monocytosis upon the anti-
body response in rabbits to various antigens.
Canad. J. Biochem. Physiol. 32, 1 (1954)
- 35 - The presence of antibody in macrophage extracts,
ibidem 32, 14 (1954)
- 36 Girard, K.F. and W.F. Gavin:
Listeriosis in the newborn.
J. Path. Bact. 74, 93 (1957)
- 37 Girard, K.F., A.J. Sbarra, E. Mannis and W.A. Bardawil:
Hemolysin studies on *Listeria monocytogenes*.
Bacteriol. Proc. 77 (1962)
- 38 Girard, K.F. and A.J. Sbarra:
Some studies on the selective isolation of *Listeria mono-*
cytogenes and their clinical applications with findings to
date.
in: Second Symposium on Listeric infection; ed. by M.L.
Gray, Montana State College, Bozeman 159 (1963)
- 39 - Some characteristics of the soluble hemolysin of *Listeria*
monocytogenes. ibidem 198 (1963)

- 40 Gorzynski, E. A., E. Neter:
Influence of temperature and pH on heterogenetic bacterial antigen.
J. Bact. 82, 784 (1961)
- 41 Grabar, P. and C. A. Williams, jr.:
Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.
Biochim. biophys. Acta 17, 67 (1955)
- 42 Gray, M. L., H. J. Stafseth and F. Thorp, jr.:
The use of sodium azide, potassium tellurite, and acetic acid in a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*.
J. Bact. 59, 443 (1950)
- 43 Gray, M. L., H. J. Stafseth and F. Thorp, jr.:
Colonial dissociation of *Listeria monocytogenes*.
Zbl. Bakt. I. Orig. 169, 378 (1957)
- 44 Gray, M. L.:
Listeria monocytogenes and Listeric infection in the diagnostic laboratory.
Ann. New York Acad. Sciences 98, 686 (1962)
- 45 Griffin, A. M., M. L. Robbins:
The flagellation of *Listeria monocytogenes*.
J. of Bact. 48, 114 (1944)
- 46 Grün, L. und H. Kühn:
Erfahrungen und Ergebnisse bei der serologischen Untersuchung von *Staphylococcus pyogenes**aureus.
Zsch. f. Hyg. 144, S. 535 (1958)
- 47 Gubarew, E. M.:
Bacteriochemie. Gustav Fischer Verlag, Jena (1958)
- 48 Hagemann, U., H. Simon und A. Bienengraber:
Die Listeriose der Frühgeburten. Beitrag zur Histogenese und Pathergie. Zbl. allg. Path. u. path. Anatomie 90, 17 (1953)

- 49 Hamon, Y. et Y. Peron:
Etude du pouvoir bactériocinogène dans le genre *Listeria*.
a) I. Propriétés générales de ces bactériocines.
Ann. Inst. Pasteur 103, 876 (1962)
b) II. Individualité et classification des bactériocines
in cause.
Ibidem 104, 55 (1963)
- 51 Harris, T.N. and Harris, S.:
Agglutination by human sera of erythrocytes incubated
with Streptococcal culture concentrats.
J. Bact. 66, 159 (1953)
- 52 Hartwigk, H.: Morphologische und kulturelle Eigenschaften von *Listeria monocytogenes*.
In: Listeriosen, herausgegeben von E. Roots und D. Strauch
Zbl. Vet. Med. Suppl. 1, 5 (1958)
- 53 Hintz, W.: cit. nach J. Potel und L. Degen (108)
- 54 Hood, M.: Isolation techniques and identification of cultures of
Listeria monocytogenes.
In: Second Symposium on Listeric infection; ed. by M. L.
Gray, Montana State College, Bozeman 165 (1963)
- 55 Jaeger, R.F. and D.M. Myers:
Listeria monocytogenes - a study of two strains isolated
from human Listeriosis.
Canad. J. Microbiol. 1, 12 (1954)
- 56 Jasinska, S., Z. Wachnik, A. Seniow, A. Skurski:
Phagocytic and serological studies in the course of im-
munization of rabbits with *Listeria monocytogenes*. Arch.
Immunol. Therap. Dosw. 8, 617 (1960);
cit. n. Seeliger H.P.R. (142)
- 57 Jensen, K.: A normally occurring Staphylococcal antibody in human
serum. Acta path. microb. scand. 44, 421 (1958)

- 58 Kabat, E. A. and M. M. Mayer:
Experimental Immunochemistry. 2nd Edition, Charles C. Thomas,
Springfield, Ill. (1961)
- 59 Kirby, W. M. M.:
Hemagglutination reaction in Streptococcal infections and acute
rheumatic fever. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 78, 519 (1951)
- 60 Köhler, W.:
Der Antistreptolysin-Normaltiter in NO-Deutschland; Untersu-
chungen an 600 Personen. Zschr. Immunforschg. 116, 145 (1958)
- 61 Köhler, W.:
Die Serologie des Rheumatismus und der Streptokokkeninfektion.
Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie, Heft 9 Joh. Ambrosius
Barth. Verlag, Leipzig (1959)
- 62 Kwapinski, J. B.:
Methoden zur Gewinnung und zur immunochemischen Analyse
der Teilantigene von Mikroorganismen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 192, 399 (1964)
- 63 Lancefield, R. C.:
A serological differentiation of human and other groups of he-
molytic Streptococci. J. Exp. Med. 57, 571 (1933)
- 64 Landsteiner, K.:
Die Spezifität serologischer Reaktionen. Julius Springer Verlag
(1933)
- The specificity of serological reactions. Havard Univ. Press,
Cambridge, Mass. (1945)
- 65 Lang, K.: Listeria-Infektion als mögliche Ursache früherworbener Cerebral-
schäden. Zsch. f. Kinderheilk. 76, 328 (1955)
- 66 Lehnert, C.:
Die Tenazität von Listeria monocytogenes in der Außenwelt.
Zbl. Bakt. I. Orig. 180, 350 (1960)
- 67 Leifson, E. and M. I. Palen:
Variations and spontaneous mutations in the genus Listeria
in respect to flagellation and motility. J. of Bact. 70, 233 (1955)

- 68 Linser, H.: Beitrag zur serologischen Diagnose der Listeriose.
Berl. Münch. tierärztl. Wochschr. 69, 223 (1956)
- 69 Mannweiler E., Lippelt, H.:
Untersuchungen zur Serodiagnostik der Listeriose.
Schweiz. Zsch. f. Path. u. Bakt. 19, 758 (1956)
- 70 Marrack, J.R.: Sensitivity and specificity of methods of detecting antibodies. Brit. Medical Bulletin 19, 178 (Sept. 1963)
- 71 Matthias, D.: Zur Pathologie und Pathogenese der Listeriose einiger Haustiere. Arch. exp. Vet. med. 15, 905 (1961)
- 72 Metzger, J.F. and C.W. Smith:
Serological typing of *Listeria monocytogenes* by gel diffusion using thermostable antigens.
Proc. Soc. exp. Med. a. Biol. 110, 903 (1962)
- 73 Middlebrook, G. and R.F. Dubos:
Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of Tubercle bacilli.
J. Exp. Med. 88, 521 (1948)
- 74 Mitchell, P. and J. Moyle:
Occurrence of a phosphoric ester in certain bacteria its relation to Gram staining and penicillin sensitivity.
Nature 166, 218 (1950)
- 75 Murray, E.G.D., R.A. Webb and M.B.R. Swann:
A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.)
J. Path. Bact. 29, 407 (1926)
- 76 Murray, M. and F. Moosnick:
Incidence of bacteraemia in patients with dental disease.
J. Labor. a. Clin. Med. 26, 801 (1941)
- 77 Neter, E. and E.A. Gorzynski:
Studies on indirect Staphylococcal hemagglutination.
Zsch. Immunforschg. 118, 269 (1959)

- 78 Neter, E., E.A. Gorzynski, A.M. Drislane, A.H. Harris, E. Rajnovich:
Detection of Staphylococcal antibodies in human gamma globulin and serum by hemagglutination tests.
Proc. Soc. Exp. Biol. a Med. 101, 484 (1959)
- 79 Neter, E., H. Anzai and E.A. Gorzynski:
Identification of an antigen common to *Listeria monocytogenes* and other bacteria.
Proc. Soc. Exp. Biol. a Med. 105, 131 (1960)
- 80 Neter, E., Rajnovich, E. and E.A. Gorzynski:
Study of Staphylococcal antibodies of the Rantz-type.
Pediatrics 25, 21 (1960)
- 81 Njoku-Obi, A.N. and E. Jenkins:
Quantitative aspects and nature of soluble hemolysins of *Listeria monocytogenes*.
Bact. proceed. 77 (1962)
- 82 Njoku-Obi, A.N. U. :
Serologic aspects of Listeriosis: The Antigen-Fixation Test.
In: Second Symposium on Listeric infection; ed. by M.L. Gray, Montana State College, Bozeman 223 (1963)
- 83 Njoku-Obi, A.N., E.M. Jenkins, J.C. Njoku-Obi, E.W. Adams and V. Covington:
Production and nature of *Listeria monocytogenes* hemolysins.
J. Bact. 86, 1 (1963)
- 84 Oeding, P.: Serological typing of Staphylococci. *Acta path & microbiol. Scand.*, suppl. 93, 356 (1953)
- 85 - II. Investigations on the serological, chemical and physical properties of the antigens. *Ibidem* 33, 312 (1953)
- 86 - III. Further investigations and comparison to phage-typing. *Ibidem* 33, 324 (1953)
- 87 Osebold, J.W. and A.N. Njoku-Obi:
Resistance mechanisms in Listeriosis. In: Second Symposium on Listeric infection; ed. by M.L. Gray, Montana State College, Bozeman 60 (1963)

- 88 Osebold, J.W. and M.T. Sawyer:
Agglutinating antibodies for *Listeria monocytogenes* in human serum.
J. Bact. 70, 350 (1955)
- 89 Ouchterlony, Ö.:
Antigen-Antibody reactions in gels. *Acta path. micr. Scand.* 26, 507 (1949)
- 90 Özgen, H.:
Über die *Listeria monocytogenes*.
Inaug. Diss. Giessen (1951)
- 91 -
Zur Serologie der *Listeria monocytogenes*.
Zschr. f. Tropen med. 4, 40 (1952)
- 92 Packalén, Th.: Beta-haemolytic *Streptococci* in throat and anti-streptolysin titre. *Acta path. microbiol. scand.* 26, 568 (1949)
- 93 Pakula, R. and W. Walczak:
An erythrocyte-sensitizing factor common to *Staphylococci* and haemolytic *Streptococci*.
Acta Microbiol. polonica 4, 235 (1955)
- 94 Palmer, J., T. Gerlough:
A simple method for preparing antigenic substances from the typhoid bacillus.
Science (New Series) 92, 155 (1940)
- 95 Paterson, J.S.: Flagellar antigens of organisms of the genus *Listerella*.
J. Path. Bact. 48, 25 (1939)
- 96 -
The antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*. *J. Path. Bact.* 51, 427 (1940)
- 97 Patočka, F., R. Benda, J. Stárky:
Cesk. Hyg. Epid., Mikrobiol. 2, 325 (1953) cit. n.
Seeliger H.P.R. (139)
- 98 Patočka, F., J. Schindler, M. Mára:
Studies on the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*.
I. Protein substances isolated from cells of *Listeria monocytogenes* enhancing Listeric infection. *Zbl. Bakt. I. Orig.* 174, 573 (1959)

- 99 Pirie, J.H.H.: A new disease of veld rodents "Tiger River Disease".
Publ. S. Afr. Inst. Med. Res. 3, 163 (1927)
- 100 Porges, O.: Über die Agglutinabilität der Kapselbakterien. Wien.
klin. Wchschr. (1905) S. 691, cit. n. Seelemann (133)
- 101 Pöschel, Th., H. Schwind:
Zur Bedeutung des Listeriosetiters in der Gravidität.
Arch. Gyn. 193, 294 (1959)
- 102 Potel, J.: Zur Granulomatosis infantiseptica.
Zbl. Bakt. I. Orig. 158, 329 (1952)
- 103 Potel, J.: Ätiologie der Granulomatosis infantiseptica (Bakterio-
logie, Diagnose, Epidemiologie, Therapie).
Wiss. Zschr. Martin Luther Univ. Halle/S. 3, 341
(1953/54)
- 104 - Sechs Jahre Listeriose-Forschung und -Diagnose mit
besonderer Berücksichtigung der Neugeborenenlisteriose.
Arch. Hyg. Bakt. 139, 245 (1955)
- 105 - Wo stehen wir im Wissen über die Listeriose? Die Me-
dizinische 27/28, 977 (1956)
- 106 - Zum gegenwärtigen Stand der Listerioseforschung.
Wiss. Zschr. Martin Luther Univ. Halle/S 6, 311 (1957)
- 107 Potel, J. und L. Degen:
Zur Serologie und Immunbiologie der Listeriose.
I. Mitteilung: Die Wachstumsprobe. Zbl. Bakt. I. Orig.
180, 61 (1960)
- 108 - II. Mitteilung: Untersuchungen von Fraktionen aus Listeria
monocytogenes und eines Haptens (Allergens) für die
Intrakutandiagnose der Listeria-Infektion.
Zbl. Bakt. I. Orig. 182, 210 (1961)
- 109 - III. Mitteilung: Vergleichende Untersuchungen verschiede-
ner serodiagnostischer Methoden. Zbl. Bakt. I. Orig.
185, 204 (1962)

- 110 Potel, J.: Isolation techniques and identification of cultures of *Listeria monocytogenes*. In: Second Symposium on Listeric infection; ed. by M. L. Gray, Montana State College, Bozeman 168 (1963)
- 111 - New concepts in serology of *Listeria monocytogenes* in serologic diagnosis of Listeriosis. In: Second Symposium on Listeric infection; ed. by M. L. Gray, Montana State College, Bozeman 235 (1963)
- 112 Protz, D.: Studie über das Potel'sche *Listeria* Antigen. Inaug. Diss. Fr. Uni. Berlin, Journal Nr. 388 (1962)
- 113 Rabl, R., Seelemann, M.:
Die Biologie und pathogene Bedeutung der Streptokokken bei Erkrankungen an den Zähnen.
Z. Hyg. 132, 394 (1954)
- 114 Rantz, L. A., Zuckerman, A. and E. Randall:
Hemolysis of red blood cells treated by bacterial filtrates in the presence of serum and complement.
J. Lab. Clin. Med. 39, 443 (1952)
- 115 Rantz, L. A., E. Randall and A. Zuckerman:
J. Inf. Dis., 98, 211 (1956) cit. nach Neter u. a. (79)
- 116 Reichertz, P. und H. P. R. Seeliger:
Untersuchungen zur Frage der Beziehung zwischen Serumantikörpern und Hautreaktionen bei Verdachtsfällen von Listeriose. Zschr. f. klin. Med. 157, 331 (1962)
- 117 Reploh, H. und H. J. Otte:
Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie und Infektionskrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1961)
- 118 Robbins, M. L. und A. M. Griffin:
Studies on *Listerella monocytogenes*.
I. The effect of various killing agents on the flagellar antigens. J. Immunol. 48, 63 (1944)

- 119 Robbins, M. L. and A. M. Griffin:
II. The effect of heat and alcohol on the stable (somatic) antigens. *J. Immunol.* 50, 237 (1945)
- 120 -
III. Antibody response to individual components of the antigen mosaic during immunization. *J. Immunol.* 50, 247 (1945)
- 121 Roemer, G. B.:
Das serologische und biologische Verhalten der für den Menschen pathogenen Streptokokken. *Erg. Hyg.* 26, 139 (1949)
- 122 Round, H., H. J. R. Kirkpatrick and C. G. Hails:
Further investigations on bacterial infections of the mouth. *Proc. Roy. Soc. Med.* 29, 1552 (1936)
- 123 Rudolph, W., A. Gräßer:
Zur Typendifferenzierung von *Listeria monocytogenes* mit verschiedenfarbig fluoreszierenden Antiseren. *Monatsh. f. Vet. med.* 18, 138 (1963)
- 124 Sachse, H.: Über die Agglutinierbarkeit mit Fuller-Extrakten von Streptokokken beladener Erythrocyten durch Kaninchen-Immunsere. *Arch. Hyg.* 139, 224 (1955)
- 125 Sachse, H., J. Potel:
Über Kreuzreaktionen zwischen Hämosensitinen aus Streptokokken und Listerien. *Zschr. f. Immunforsch.* 114, 472 (1957)
- 126 Salton, M. R. J., Horne, R. W.:
Studies of the bacterial cell wall.
II. Methods of preparation and some properties of cell walls. *Biochim. et Biophys. Acta* 7, 177 (1951)
- 127 -
III. Preliminary investigations of the chemical constitution of the cell wall of *Streptococcus faecalis*. *Ibidem* 8, 510 (1952)
- 128 -
IV. The composition of the cell walls of some grampositive and gramnegative bacteria. *Ibidem* 10, 512 (1953)
- 129 Scheidegger, J. J.:
Une microméthode de l'immuno-électrophorèse. *Intern. Arch. Allergy* 7, 103 (1955)

- 130 Schierz, G.: persönliche Mitteilung
- 131 Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie. D. Steinkopff-Verlag Darmstadt 1955 (2. Aufl.)
- 132 Seastone, C. V.: Pathogenic organisms of the genus *Listerella*. *J. exp. Med.* 62, 203 (1935)
- 133 Seelemann, M., G. Obiger:
Über die Herstellung gruppenspezifischer Seren zur Streptokokken-Differenzierung. *Zschr. f. Hyg.* 144, 503 (1958)
- 134 Seeliger, H. P. R.:
Zur Serodiagnostik der Listeriose mittels der Agglutinations- und Komplementbindungs-Reaktion. *Z. Immunforsch.* 110, 252 (1953)
- 135 Seeliger, H. P. R. und G. Linzenmeier:
Die Listeriose und ihre Erreger. *Z. Hyg.* 136, 335 (1953)
- 136 Seeliger, H. P. R.:
Serologische Kreuzreaktionen zwischen *Listeria monocytogenes* und Enterokokken.
Z. Hyg. 141, 15 (1955)
- 137 Seeliger, H. P. R. and F. Sulzbacher:
I. Antigenic relationship between *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*.
Canad. J. Microbiol. 2, 220 (1956)
- 138 Seeliger, H. P. R.:
Wie sind Listeriatiter zu bewerten, und in welchen Altersgruppen bzw. bei welchen klinischen Prozessen erscheinen serologische Untersuchungen auf Listeriose angebracht? *Dt. med. Wochschr.* 82, 487 (1957)
- 139 Seeliger, H. P. R.:
Die Serodiagnostik der Listeriose. In: *Listeriosen*, herausgegeben von E. Roots und D. Strauch. *Zbl. Vet. med. Suppl.* 1, 20 (1958)

- 140 Seeliger, H.P.R.: Listeriose
 - a) Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie Heft 8
Joh. Ambrosius Barth Verlag, Leipzig (1958) 2. Aufl.
 - b) Listeriosis. Hafner Pub.Co., Inc., New York
2ndEd. (1961)
- 141 Seeliger, H.P.R. and F. Sulzbacher:
An appraisal of Castellani's absorption test with special
reference to its application in the serological diagnosis
of human Listeriosis.
Dermatol. Tropica 1, 40 (1962)
- 142 Seeliger, H.P.R.: Serology of human Listeriosis. In: Second Symposium
on Listeric infection, ed. by M.L. Gray, Montana State
College, Bozeman 227 (1963)
- 143 Shattock, P.M.F. and A.I.R. Mattick:
The serological grouping of *Streptococcus lactis* (group N)
and its relationship to *Streptococcus faecalis*.
I. Hyg. (Lond.) 43, 173 (1943); cit.n.133, Seelemann
- 144 Smith, C.W., J.D. Marshall jr. and W.C. Eveland:
Investigation of *Listeria monocytogenes* by the fluores-
cent antibody technique. Bact. Proceed. 91 (1959)
- 145 Smith, C.W., J.D. Marshall jr. and W.C. Eveland:
Identification of *Listeria monocytogenes* by the fluores-
cent antibody technic. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 103,
842 (1960)
- 146 Smith, C.W., J.F. Metzger:
Identification of *Listeria monocytogenes* in experimen-
tally infected animal tissue by immuno-fluorescence.
In: Second Symposium on Listeric infection; ed. by M.L.
Gray, Montana State College, Bozeman 179, (1963)
- 147 Smith, C.W., J.F. Metzger:
The dynamics of the serology of *Listeria monocytogenes*.
In: Second Symposium on Listeric infection, ed. by M.L.
Gray, Montana State College, Bozeman 244 (1963)

- 148 Stanley, N.F.: Studies on *Listeria monocytogenes*. I. Isolation of the monocytosis-producing agent (MPA). Austral. J. Exp. Biol. a. Med. 27, 123 (1949)
- 149 Stanley, N.F.: The augmenting action of lecithin and the lipoids of *Aspergillus fumigatus* and *Listeria monocytogenes* in antibody production using *Salmonella typhimurium* as an antigen. Ibidem 28, 109 (1950)
- 150 Stavitsky, A.B.: Micromethod for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein treated red blood cells. J. of Immunol. 72, 360 (1954)
- 151 - II. Specific applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein treated red blood cells. Ibidem 72, 368 (1954)
- 152 Sword, C.P.: All-University Virus Conference in Davis, California, im Okt. 1957 cit. nach Seeliger (140)
- 153 Sword, C.P. and M.J. Pickett: Bacteriophage typing of *Listeria monocytogenes*. Bact. proceed 38 (1958)
- 154 - The isolation and characterization of bacteriophages from *Listeria monocytogenes*. J. Gen. Microbiol. 25, 241 (1961).
- 155 Taylor, F.E.: The absorption or saturation test of Castellani: its applications in serodiagnosis, and in the recognition of bacterial species. J. Hyg. (Camb.) 17, 415 (1918)
- 156 Tubylewicz, H.: Studies on the antigenic structure of *Listeria monocytogenes*. I. The chemical structure of protein substances isolated from eight strains of *Listeria monocytogenes*. Bull. Acad. Polonaise, Ser. Sci. Biol. 8, 57 (1960)

- 157 Tubylewicz, H.: II. The serological properties of proteins isolated from eight strains. Bull. Acad. Polonaise, Ser. Sci. Biol. 9, 241 (1961)
- 158 - III. The chemical structure and serological properties of the lipid fractions isolated from eight strains. Ibidem 9, 353 (1961)
- 159 - IV. Antigenic properties and chemical structure of saccharide fractions isolated from eight strains. Ibidem 10, 151 (1962)
- 160 Urbach, H., G. Schabinski:
Zur Listeriose des Menschen. Zsch. Hyg. 141, 239 (1955)
- 161 Webb, R.A. and M. Barber:
Listerella in human meningitis. J. Path. Bact. 45, 523 (1937)
- 162 Welshimer, H.J.: Staphylococcal antibody production in response to injections with *Listeria monocytogenes*. J. Bact. 79, 456 (1960)
- 163 - Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. J. Bact. 80, 316 (1960)
- 164 - Some serological reactions observed with *Listeria monocytogenes*. In: Second Symposium on Listeric infection; ed. by M.L. Gray, Montana State College, Bozeman 237 (1963)
- 165 - Vitamin requirements of *Listeria monocytogenes*. J. Bact. 85, 1156 (1963)
- 166 Westphal, O., O. Lüderitz, F. Bister:
Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Zschr. f. Naturforschg. 7b, 148 (1952)
- 167 Wiley, B.B.: The incidence of encapsulated Staphylococci and anti-capsular antibodies in normal humans. Canad. J. Microbiol. 9, 27 (1963)

- 168 Wilson, M.W. and B.H. Pringle:
Interpretation of the Ouchterlony precipitin test.
J. of Immun. 75, 460 (1955)
- 169 - Cross-reactions in the Ouchterlony plate: Analysis of
native and halogenated bovine serum albumins.
J. of Immun. 77, 324 (1956)
- 170 - The agar diffusion precipitin technique. A comparison
of the simple and double diffusion methods.
J. of Immun. 81, 317 (1958)
- 171 Winblad, S.: Studies of antibodies in human Listeriosis.
I. Antibodies in cases of bacteriologically verified
human Listeriosis. Acta path. microb. scand. 58,
123 (1963)
- 172 Zipplies, G.: Über bakterielle Reizstoffe aus Listeria monocytogenes
und ihre Wirkung am Kaninchen (Intracutantest).
Arch. exp. Vet. Med. 11, 816 (1957)
- 173 Znamirovski, R., A.M. Collins, E. Neelin and T.E. Roy:
Canad. J. Publ. Health 50, 30 (1959) cit.n. Neter
u. a. (78)

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Eyer möchte ich für die Unterstützung der Arbeit danken, sowie Herrn Dr. Schierz für die Überlassung des Themas und seine Ratschläge und großzügige Hilfe bei der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 28. 10. 1941 wurde ich in Stuttgart als zweites Kind des damaligen Hauptmanns Heinz Burger, jetzt Oberst i. G., und seiner Ehefrau Marianne, geborene Glauner, geboren. Zusammen mit zwei Geschwistern wuchs ich in Ludwigsburg auf, besuchte dort die Volksschule und das Goethe-Gymnasium, an dem ich im April 1961 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1961 immatrikulierte ich mich an der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen. Nach dem Physikum setzte ich im November 1963 mein Studium an der Universität München fort. Hier arbeitete ich am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene an meiner Dissertation und legte nach sechs klinischen Semestern im Herbst 1966 die ärztliche Prüfung ab.



